

MÁSTER INTERUNIVERSITARIO EN MEJORA GENÉTICA  
ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

**Activación de espermatozoides de  
mamíferos con el ionóforo A23187**

Tesis de Máster  
Valencia, Julio 2018

**Daniel Emmanuel Serrano Trujillo**

Directores:  
Serafín Pérez Cerezales  
Alfonso Gutiérrez Adán

## AGRADECIMIENTOS

Al IAMZ-CIHEAM por el apoyo económico. A la UAB y UPV por la organización del máster. A mis directores de tesis, por abrirme las puertas de sus laboratorios y guiarme en el desarrollo de este trabajo. A mis compañeros del INIA que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme. A mis compañeros del máster, de los cuales me llevo gratas experiencias. A mi familia por su apoyo, motivación y ánimo.

## RESUMEN

Los espermatozoides de mamíferos adquieren la capacidad fecundante en el tracto femenino en un proceso llamado capacitación. Sin embargo de los millones de espermatozoides que se producen y eyaculan solo una fracción muy pequeña, estimada en torno al 10%, adquiere este estadio capacitado en un momento dado. Nuestra hipótesis es que es posible activar otras subpoblaciones no capacitadas para que adquieran la habilidad de fecundar mediante la inducción de procesos relacionados con la capacitación. A nivel molecular, uno de estos procesos es el aumento del calcio intracelular. Por esta razón, los ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$ , como el A23187, son comúnmente usados como inductores de capacitación espermática al provocar la entrada de calcio al citoplasma del espermatozoide y producir cambios equiparables a la capacitación, como por ejemplo la inducción de un tipo de motilidad vigoroso conocido como hiperactivación. El objetivo del presente trabajo fue conseguir la activación de poblaciones espermáticas no capacitadas mediante la utilización del ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  A23187 (a partir de ahora solo se denominará como ionóforo) tanto en ratón como en toro. En espermatozoides de ratón observamos que el tratamiento con concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{M}$  de ionóforo provocó hiperactivación e inducción de la reacción acrosómica a un mismo nivel alcanzando saturación en ambas respuestas. Además, utilizando una concentración subóptima de espermatozoides para realizar la fecundación *in vitro*, el tratamiento con 5  $\mu\text{M}$  de ionóforo aumentó la tasa de fecundación de un 49% obtenida en el control a un 68% ( $P < 0,05$  de acuerdo con ANOVA). Sin embargo el tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  provocó un ligero descenso en la tasa de fecundación con respecto al control indicando cierto nivel de toxicidad a esta concentración. En espermatozoides de toro observamos una tasa de reacción acrosómica elevada en la muestra control (76%). Esto se debió a que utilizamos muestras criopreservadas y el mismo proceso de congelación/descongelación induce la reacción acrosómica. El tratamiento con ionóforo no aumento esta tasa de reacción acrosómica posiblemente porque todos los espermatozoides susceptibles ya estaban reaccionados por el propio proceso de congelación/descongelación. Tampoco encontramos efecto alguno del tratamiento con ionóforo sobre la capacidad fecundante de estos espermatozoides de toro. Los resultados indican que en ratón existe una subpoblación sensible a la activación por el

ionóforo que se hiperactiva, pierde su acrosoma y es capaz de fecundar en condiciones *in vitro*. Sin embargo en toro pensamos que el proceso de criopreservación seminal ya ha activado esta subpoblación haciéndola insensible al ionóforo.

## SUMMARY

Mammalian spermatozoa acquire the fertilizing capacity in the female tract in a process called capacitation. However, of the millions of spermatozoa that are produced and ejaculate only a very small fraction, estimated at around 10%, acquires this capacitation stage at a given time. Our hypothesis is that it is possible to activate other subpopulations not activated to acquire the ability to fertilize by inducing processes related to capacitation. At the molecular level, one of these processes is the increase in intracellular calcium. For this reason,  $\text{Ca}^{2+}$  ionophores, such as A23187, are commonly used as inducers of sperm capacitation by causing the entry of calcium into the cytoplasm of the spermatozoa and produce changes comparable to capacitation, such as the induction of a vigorous motility type known as hyperactivation. The aim of the present work was to achieve the activation of non-capacitated sperm subpopulations through the use of the  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore A23187 (referred to hereafter as ionophore) in both mouse and bull. In mouse spermatozoa we observed that the treatment with concentrations of 5 and 10  $\mu\text{M}$  of ionophore caused hyperactivation and induction of the acrosome reaction at the same level, reaching saturation in both responses. In addition, using a suboptimal concentration of spermatozoa to perform *in vitro* fertilization, treatment with 5  $\mu\text{M}$  of ionophore increased the fertilization rate from 49% obtained in the control to 68% ( $P < 0.05$  according to ANOVA). However, treatment with 10  $\mu\text{M}$  caused a slight decrease in the fertilization rate with respect to the control indicating a certain level of toxicity at this concentration. In bull spermatozoa we observed a high level of acrosome reaction in the control sample (76%). This was possibly due to the fact that we use cryopreserved samples and the freezing/thawing process could have induced the acrosome reaction by itself. The ionophore treatment did not increase this rate of acrosome reaction possibly because all the susceptible spermatozoa were already reacted by the freezing/thawing process itself. Nor did we find any effect of the ionophore treatment on the fertilizing capacity of these bull spermatozoa. The results indicate that in the mouse there is a subpopulation sensitive to activation by the ionophore that becomes hyperactive, loses its acrosome and is able to fertilize under *in vitro* conditions. However in bull we think that the process of sperm

cryopreservation has already activated this subpopulation making it insensitive to the ionophore.

# ÍNDICE

Sección	Página
1. Introducción	1
2. Objetivos	3
3. Revisión bibliográfica	4
3.1. Espermatogénesis	4
3.2. Morfología espermática	5
3.3. Maduración espermática	8
3.4. Capacitación	9
3.4.1. Adquisición de la motilidad hiperactivada	9
3.4.1.1. Evaluación de la motilidad espermática mediante uso de sistemas CASA	10
3.4.2. Cambios a nivel de la membrana plasmática durante la capacitación	11
3.4.3. Cambios en los estados de fosforilación durante la capacitación	12
3.4.4. Reacción acrosómica	13
3.4.4.1. Evaluación de la reacción acrosómica.	16
3.5. Agentes capacitantes e inductores de la reacción acrosómica <i>in vitro</i>	16
3.5.1. Papel del calcio en la capacitación	18
3.5.2. Uso del ionóforo A23187	19
4. Materiales y métodos	21
4.1. Reactivos	21
4.2. Animales	21
4.3. Espermatozoides	21
4.3.1. Ratón	21
4.3.2. Toro	22
4.4. Tratamiento con el ionóforo A23187	22
4.4.1. Ratón	22
4.4.2. Toro	23
4.5. Análisis de la motilidad	24
4.6. Análisis de la reacción acrosómica	25
4.7. Evaluación de la capacidad fecundante: producción <i>in vitro</i> de blastocistos murinos	26
4.7.1. Obtención de ovocitos	26
4.7.2. Fecundación <i>in vitro</i> (FIV)	27
4.7.3. Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	27
4.8. Evaluación de la capacidad fecundante: producción <i>in vitro</i> de blastocistos bovinos	28
4.8.1. Recolección de ovocitos	28
4.8.2. Maduración <i>in vitro</i> (MIV)	28
4.8.3. Fecundación <i>in vitro</i> (FIV)	29
4.8.4. Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	29

4.9. Estadística	29
5. Resultados	31
5.1. Ratón	31
5.1.1. Análisis de la motilidad mediante CASA	31
5.1.2. Análisis de la reacción acrosómica	31
5.1.3. Evaluación de la capacidad fecundante mediante fecundación <i>in vitro</i>	32
5.2. Toro	34
5.2.1. Análisis de la reacción acrosómica	34
5.2.2. Evaluación de la capacidad fecundante mediante fecundación <i>in vitro</i>	35
6. Discusión	36
6.1. Análisis objetivo de la motilidad en ratón	36
6.2. Análisis de la reacción acrosómica en ratón y toro	39
6.3. Evaluación de la capacidad fecundante en ratón y toro	41
7. Conclusiones	44
8. Referencias bibliográficas	45
9. Anexos	56

# 1. INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides son el tipo de célula más diverso que se conoce. Esta diversidad refleja la adaptación a las condiciones bajo las cuales funcionan los espermatozoides como una forma de asegurar su supervivencia en los ambientes de fecundación y así maximizar su capacidad fecundante (Franzén, 1977). La existencia de diversidad morfológica entre especies es ampliamente asumida, aunque esta diversidad parece menos clara a medida que profundizamos (entre machos, entre eyaculados del mismo macho e incluso dentro del mismo eyaculado), con diferentes teorías que abordan esta heterogeneidad (Ramón et al., 2014).

El eyaculado es una mezcla heterogénea de diferentes subpoblaciones de espermatozoides (Ramón et al., 2014). Además de la fracción anormal o inmóvil, dentro de la subpoblación móvil normal, se pueden diferenciar varias fracciones por sus propiedades específicas. Esto significa que los espermatozoides pueden ser agrupados de acuerdo a sus patrones de motilidad (Martínez-Pastor et al., 2011). La presencia/ausencia de patrones específicos de motilidad y subpoblaciones han sido correlacionadas con la fertilidad y el éxito de las tecnologías de la reproducción asistida (TRA) (Krause, 1995). Curiosamente, la heterogeneidad de los espermatozoides también se ha demostrado a nivel epigenético a través del hallazgo de que el mismo eyaculado humano muestra diferentes fracciones de espermatozoides con diferentes regiones de ADN metilado (Jenkins et al., 2014). Además, dentro del mismo eyaculado coexisten espermatozoides con diferentes grados de fragmentación del ADN (Ribas-Maynou et al., 2012). Colectivamente, estas líneas de evidencia apuntan a la presencia de un número de subpoblaciones de diferente calidad en la misma muestra. Por lo tanto, es ampliamente aceptado que no todos los espermatozoides en un eyaculado son igualmente buenos en la fecundación y que una fracción de alta calidad es seleccionada dentro del tracto genital femenino (Pérez-Cerezales et al., 2018).

Como consecuencia, está creciendo el interés en caracterizar a las subpoblaciones de espermatozoides como una herramienta analítica de la calidad seminal en especies de mamíferos incluyendo vacas (Ferraz, 2014), ovejas (Luna et al.,

2015), caballos (Quintero-Moreno et al., 2003) y humanos (Davis y Siemers, 1995), entre otros.

En los mamíferos, un gran número de espermatozoides eyaculados entran en el útero. Sin embargo, sólo un número limitado de espermatozoides alcanzan el istmo de los oviductos (Overstreet y Cooper, 1975). La mayoría de los espermatozoides que llegan a la ampolla han sufrido cambios fisiológicos para prepararlos para la fertilización, un proceso conocido como capacitación (Muro et al., 2016). Este proceso incluye la hiperactivación de la motilidad espermática y la preparación de los espermatozoides para la reacción acrosómica (Muro et al., 2016). Recientemente, se ha informado que los espermatozoides de ratón llegan a cada ovocito ovulado de uno en uno *in vivo*, lo que indica que un espermatozoide capacitado es suficiente para llevar a cabo el proceso de fecundación de cada ovocito *in vivo* (Muro et al., 2016). Sin embargo, la fecundación *in vitro* (FIV) es mucho menos eficiente que la *in vivo*, debido a que se requiere un gran número de espermatozoides puestos directamente sobre el ovocito para conseguir la fecundación (Yanagimachi y Chang, 1963).

Los ionóforos son compuestos químicos que aumentan la permeabilidad de las membranas a iones específicos (NCBI, 1976). Los ionóforos de calcio, que se utilizan para inducir artificialmente la reacción acrosómica, aumentan la permeabilidad de las membranas de los espermatozoides a los iones de calcio (NCBI, 1991) y se ha visto que su utilización sobre espermatozoides carentes de canales específicos y necesarios para la fecundación permite recuperar su capacidad fecundante (Navarrete et al., 2016). En el presente trabajo se exploró la utilización del ionóforo A23187 para activar subpoblaciones espermáticas que en condiciones estándar de maduración *in vitro* no adquieren la capacidad de fecundar al ovocito. Para poner en contraste esta activación se redujo la concentración espermática utilizada para la FIV hasta límites subóptimos. La mejora en la eficiencia de la FIV en cuanto a la utilización de un menor número de espermatozoides puede ser de gran interés en su aplicación en muestras seminales de animales/pacientes subfértiles, muestras oligospermicas y en semen congelado o sexado donde se cuenta con un número limitado de espermatozoides.

## 2. OBJETIVOS

La hipótesis de trabajo de esta tesis es que en condiciones estándar de capacitación *in vitro* existe una población espermática inactiva que no puede llevar a cabo la fecundación pero que es susceptible de ser activada mediante el uso de agentes inductores de la hiperactivación y de la reacción acrosómica.

Para confirmar esta hipótesis el objetivo general de este trabajo ha sido conseguir la activación de dicha población espermática mediante el ionóforo de calcio A23187 en ratón y toro.

Para ello se establecieron los siguientes objetivos específicos para ambas especies:

1. Analizar el efecto del tratamiento con ionóforo A23187 sobre la motilidad de los espermatozoides.
2. Evaluar la capacidad del ionóforo A23187 para provocar la reacción acrosómica.
3. Estudiar el efecto del ionóforo A23187 sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides en fecundación *in vitro* convencional y utilizando concentraciones subóptimas de espermatozoides.

### 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Espermatogénesis

Los espermatozoides son generados en el testículo durante la espermatogénesis (Xiao y Yang 2007). Aquí se encuentran células llamadas espermatogonias que son células diploides, inmóviles y sin diferenciar. Estas células son capaces de dividirse y generar células diploides llamadas espermatocitos primarios que mediante división meiótica generan dos espermatocitos secundarios que a su vez vuelven a sufrir una segunda división meiótica generando cuatro células haploides denominadas espermátides. Finalmente, las espermátides adquieren las características distintivas del espermatozoide mediante la espermiogénesis (Figura 1). Durante la espermiogénesis tienen lugar varios cambios morfo-genéticos que incluyen: I) la formación de una única y gran vesícula denominada vesícula acrosomal, II) se genera la cabeza del espermatozoide, el cual contiene el núcleo altamente condensado, III) se origina el flagelo a partir de los centriolos, IV) se produce la migración y el ordenamiento de las mitocondrias en una vaina helicoidal alrededor del axonema en la pieza media de la cola del espermatozoide y V) se pierde gran parte del citoplasma (Olivera et al., 2006) (Figura 2).

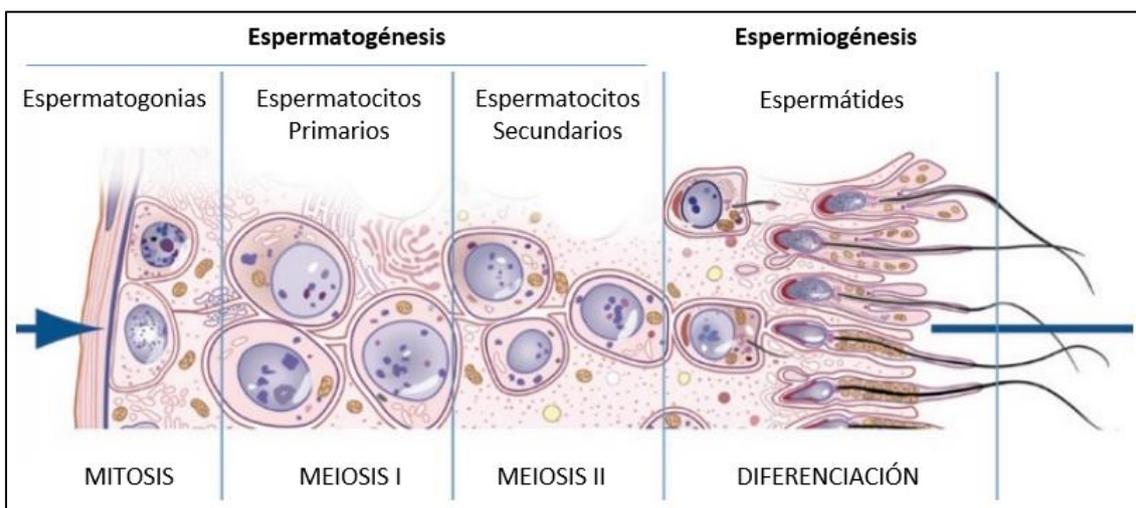


Figura 1. Representación esquemática de la formación de los espermatozoides. (Modificado de du Plessis et al., 2011).

### 3.2. Morfología espermática

Una vez que han sido completados los procesos de espermatogénesis y espermiogénesis se obtiene un espermatozoide formado por una cabeza responsable de transportar la carga nuclear y una cola la cual permite al espermatozoide atravesar el tracto reproductor femenino y las diversas envolturas que recubren al ovocito (Buffone et al., 2012) (Figura 3A).

La forma de la cabeza del espermatozoide es diferente de especie en especie, por ejemplo los espermatozoides de ratón presentan una cabeza falciforme, mientras que los espermatozoides humanos presentan una cabeza espatulada (Eddy y O'Brien, 1995). La cabeza de los espermatozoides puede ser dividida en el núcleo y en la región acrosomal, que comprende una única vesícula secretoria denominada acrosoma, que puede a su vez subdividirse en la tapa acrosomal (TA) donde se encuentran enzimas hidrolíticas que son liberadas durante la reacción acrosómica y el segmento ecuatorial (SE), que tiene una función primordial durante la fusión con el ovocito (Figura 3A y B).

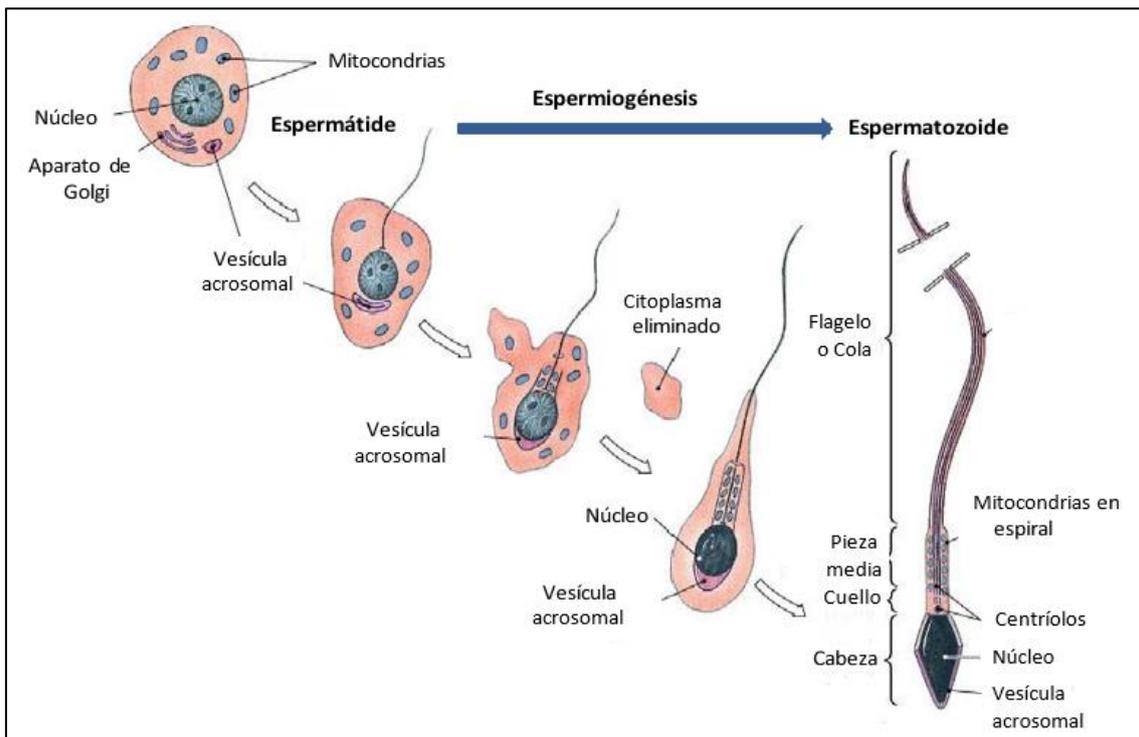


Figura 2. Representación esquemática de la espermiogénesis. La espermiogénesis produce grandes alteraciones morfo-genéticas en la espermatide lo que lleva a la obtención de una célula altamente diferenciada formada por una cabeza y una cola. (Copyright © 2012 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings).

En el núcleo se encuentra la cromatina altamente condensada y esto se debe al reemplazo de las histonas, por protaminas (Ward y Coffey, 1991). En contraste con los nucleosomas formados por las histonas, las protaminas generan estructuras muy compactas denominadas toroides que se estabilizan y compactan mediante puentes disulfuro, produciendo un empaquetamiento mayor del ADN. Este alto grado de compactación del ADN es incompatible con el proceso de replicación y transcripción (Ward y Coffey, 1991), por lo que la mayor parte de la actividad del espermatozoide se lleva a cabo mediante modificaciones postraduccionales ya que la síntesis de proteínas de novo es prácticamente nula.

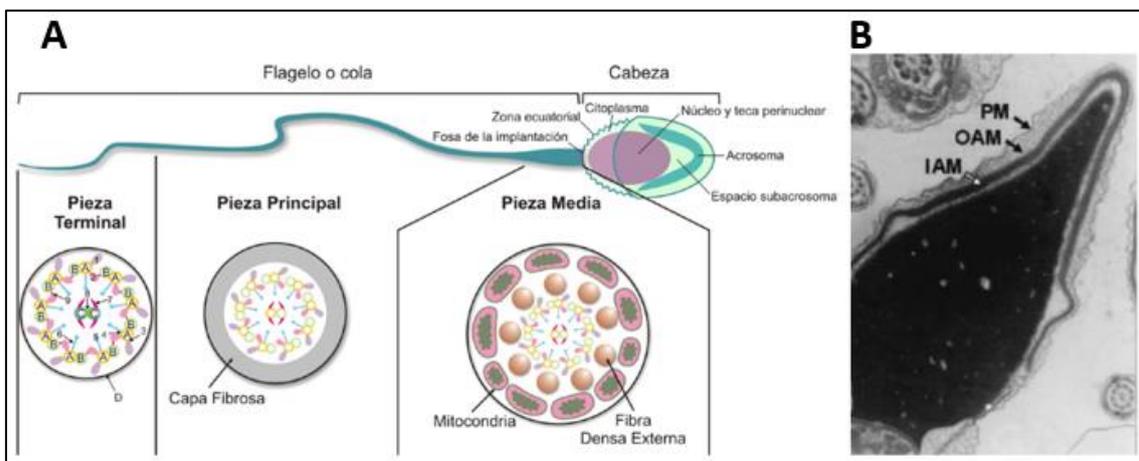


Figura 3. Características de un espermatozoide. (A) Esquema de un espermatozoide. El espermatozoide tiene dos regiones distintivas: el flagelo y la cola. El flagelo se divide en tres regiones: la pieza terminal, la pieza media y la pieza principal. La cabeza contiene el núcleo altamente condensado y, por encima de éste, la vesícula acrosomal. (B) Micrografía electrónica de la cabeza de un espermatozoide humano donde se destacan las membranas que limitan el acrosoma: la membrana acrosomal externa (MAE) cercana a la membrana plasmática (PM) y la membrana acrosomal interna (MAI) cercana al núcleo, tapa acrosomal (TA) y segmento ecuatorial (SE). (Esquema y foto modificada de Olivera et al., 2006 y Michaut et al., 2000 respectivamente).

El acrosoma es una gran vesícula que se localiza por encima del núcleo y al igual que la cabeza del espermatozoide, el tamaño y la forma de esta vesícula varía entre especies. Esta gran vesícula se origina a partir del aparato de Golgi (Yang y Sperry, 2003) y es delimitada por una membrana acrosomal interna próxima al núcleo y se continúa formando la membrana acrosomal externa, próxima a la membrana plasmática (Figura 3B). En el interior del acrosoma hay enzimas hidrolíticas, en su mayoría son glicosidasas y proteasas. Acrosina es la enzima que se encuentra en mayor proporción y la que más

se ha estudiado durante la fecundación. Los ratones doble knock-out para la enzima Acrosina (Acr-/-) siguen siendo fértiles, pero la fertilidad de su descendencia es un 50 % menor comparado con los ratones del tipo salvaje (Jin et al., 2011). Sin embargo estos ratones doble knock-out son incapaces de fecundar el ovocito en condiciones *in vitro* y esto se debe a que estos espermatozoides no pueden penetrar la matriz de las células del cúmulus. Estos descubrimientos han llevado a replantear cuál es mecanismo por el cual el espermatozoide atraviesa la zona pelúcida del ovocito, si se debe a un efecto mecánico o químico. Del mismo modo han surgido más controversias acerca de la función del acrosoma y de su contenido a partir del trabajo presentado por Jin y colaboradores, donde han demostrado en el modelo de ratón, que los espermatozoides capaces de fecundar el ovocito inician la reacción acrosómica cuando estos atraviesan la matriz del cúmulo, y no cuando se unen a la zona pelúcida del ovocito (Jin et al., 2011). Además, el gránulo acrosomal también actúa como un reservorio de  $Ca^{2+}$ , y se ha demostrado que durante la reacción acrosómica se producen movimientos de  $Ca^{2+}$  desde el acrosoma a través de canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) (Herrick, 2005).

Entre la cabeza y la cola del espermatozoide se encuentra el cuello donde se localiza el centríolo que da origen al flagelo (Figura 3A). El flagelo es el responsable de impulsar al espermatozoide a través del tracto reproductor femenino y atravesar las diversas cubiertas que rodean al ovocito como lo son las células del cúmulo y la zona pelúcida. El flagelo se puede dividir en tres regiones: la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal (Figura 3A). Internamente y a lo largo del flagelo se extiende un axonema central el cual está compuesto por una disposición característica de microtúbulos 9+2 (Eddy y O'Brien, 1995). Alrededor de esta estructura se encuentran las fibras densas externas. En la pieza media estas fibras son recubiertas por un gran número de mitocondrias, mientras que en el resto del flagelo se encuentra rodeado por la vaina fibrosa (Eddy, 2007) (Figura 3A). La gran cantidad de mitocondrias que presenta el espermatozoide son las responsables de proporcionar la energía necesaria para el trayecto que realiza el espermatozoide a través del tracto reproductor femenino.

Si bien los espermatozoides obtenidos en los procesos de espermatogénesis y espermiogénesis se caracterizan por la presencia de un flagelo y una cabeza que

contiene al núcleo celular y a la vesícula acrosomal, estos espermatozoides son inmóviles e incapaces de excitar el gránulo acrosomal, por lo que no pueden fecundar al ovocito. Por lo que los espermatozoides deben sufrir procesos post-testiculares conocidos como maduración espermática, capacitación y la reacción acrosómica.

### 3.3. Maduración espermática

Seguidamente de la espermiogénesis, los espermatozoides son liberados en una forma funcionalmente inactiva (incapaces de fecundar el ovocito) hacia la luz del túbulo seminífero donde son transportados hacia el epidídimo, lugar donde se lleva a cabo la maduración espermática. La característica más importante que se adquiere durante la maduración espermática es el desarrollo de la motilidad (Buffone et al., 2012). Si bien es cierto que se desconocen los mecanismos moleculares que conducen a la maduración espermática, este proceso ha sido profundamente relacionado con cambios producidos en la membrana plasmática ya que la misma sufre varios cambios físicos y químicos, produciéndose cambios en la localización de proteínas. Un paso fundamental durante la maduración espermática es la incorporación de proteínas del epidídimo (Sullivan et al., 2007). Estas proteínas han sido involucradas en varios procesos como la adquisición de la motilidad, efecto protector ante las especies reactivas del oxígeno, eliminación de espermatozoides defectuosos y también han sido involucradas durante la fecundación del ovocito. Además durante la maduración espermática se produce la fosforilación y la glicosilación de varias proteínas. Estos cambios actuarían como punto de control ya que impiden que el proceso de reacción acrosómica ocurra prematuramente (Yanagimachi, 1994).

Después de la maduración espermática en el epidídimo, para adquirir la capacidad de fecundar, los espermatozoides deben sufrir la capacitación espermática en el tracto reproductor femenino, fenómeno que se describirá a continuación.

### 3.4. Capacitación espermática

Una de las características sobresalientes acerca de la capacitación espermática se demostró en la década de los 50's. En 1951 Chang y Austin de forma independiente observaron que los espermatozoides recién eyaculados no eran capaces de fecundar al ovocito y que los espermatozoides deben estar en el tracto reproductor femenino por un tiempo antes de adquirir su capacidad fecundante. En el proceso de capacitación los espermatozoides sufren cambios bioquímicos y biofísicos, necesarios para fecundar el ovocito (Reid et al., 2011). Estos cambios pueden ocurrir en cuanto el espermatozoide es eyaculado mientras que otros cambios requieren un tiempo mayor de incubación en el tracto reproductor femenino (Visconti et al., 2011).

Los cambios característicos que se producen durante la capacitación son: por un lado alteraciones en los patrones de motilidad del flagelo, lo que se conoce como motilidad hiperactivada (Suarez, 2008). Por otro lado, hiperpolarización de la membrana plasmática debido a la activación de varios canales iónicos, lo que conduce a un aumento en la concentración intracelular de diferentes iones como  $K^+$  y  $HCO_3^-$  (Florman et al., 2008), además se produce una redistribución de antígenos de membrana (Gadella et al., 1995) y cambios en la composición lipídica como pérdida de colesterol (Cross, 1998). Otro rasgo característico de la capacitación es el cambio en el estado de fosforilación de varias proteínas tanto en residuos de tirosina como en residuos de serina/treonina (Visconti et al., 2011). Los cambios anteriormente mencionados llevan a la adquisición de la motilidad hiperactivada y la capacidad de excitar el gránulo acrosomal en respuesta a un estímulo apropiado, siendo estos dos fenómenos esenciales para fecundar el ovocito.

#### 3.4.1. Adquisición de la motilidad hiperactivada

Una vez que los espermatozoides son eyaculados, éstos muestran un patrón de motilidad conocido como motilidad progresiva. Sin embargo y a pesar de que los espermatozoides son móviles, éstos aún no son capaces de penetrar las diferentes envolturas que recubren el ovocito. Luego de incubar los espermatozoides en condiciones capacitantes los espermatozoides obtienen un patrón de movimiento

conocido como motilidad hiperactivada que se caracteriza por un movimiento del flagelo más amplio y más activo (Suarez, 2008). La motilidad hiperactivada es muy útil para los espermatozoides cuando se encuentran en el tracto genital femenino ya que les permite moverse en el líquido viscoso presente en el oviducto, pasar entre las células del cúmulo y una vez que ocurre la reacción acrosómica atravesar la zona pelúcida

El fenómeno de hiperactivación es iniciado por un aumento en el pH intracelular y por un aumento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los miembros de la familia de los canales CatSper (CatSper, del inglés Cation Sperm) son sensibles a la alcalinización intracelular y se ha demostrado que estos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  son fundamentales para desarrollar el fenómeno de motilidad hiperactivada, durante la capacitación espermática y en la reacción acrosómica (Lishko et al., 2011). Mutaciones en los canales CatSper en humanos han sido asociadas con infertilidad (Avenarius et al., 2009) lo cual evidencia la importancia de estos canales durante la fecundación.

#### 3.4.1.1. Evaluación de la motilidad espermática mediante el uso de sistemas CASA

Desde hace varias décadas numerosos investigadores (Glover, 1968; Katz y Dott, 1975; Amann y Hammerstedt, 1980; Katz y Overstreet, 1981; O'Connor et al., 1981) han dedicado mucho trabajo y recursos para intentar eliminar la subjetividad inherente a la evaluación microscópica de la calidad del semen. Fruto de estas investigaciones fue el desarrollo de los sistemas computarizados para el análisis de la motilidad espermática. Desde que se introdujeron en el mercado a principios de los años 80, originalmente para la evaluación de semen humano, los sistemas CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) se han ido perfeccionando y modernizando, a la vez que su precio se fue haciendo más asequible.

Un sistema CASA consta de varias unidades interdependientes: un microscopio de contraste de fases conectado a una cámara de vídeo, que envía la imagen desde el microscopio a un monitor de TV. Posteriormente, la imagen es enviada desde el monitor a un ordenador, donde un analizador digital de imagen captura varias fotografías seriadas de cada campo microscópico seleccionado, normalmente en menos de 1 segundo. Usualmente el software discrimina a los espermatozoides de otras partículas

que puedan aparecer en la imagen por su tamaño, y analiza la trayectoria recorrida por cada espermatozoide individual durante esa fracción de segundo.

Aunque los principios básicos utilizados para el análisis de las imágenes digitalizadas son similares en los diferentes sistemas CASA que existen en el mercado, hay diferencias apreciables en sus sistemas ópticos, técnicas de captura de imagen y reconocimiento espermático, algoritmos utilizados para la reconstrucción de trayectorias y determinación de las medidas cinéticas, y también en el manejo y análisis de los datos, y consecuentemente, en los resultados finales (Mortimer, 2000).

El uso de los sistemas CASA proporciona toda una serie de datos relativos a la velocidad y trayectoria de cada espermatozoide individual y ello permite identificar la existencia de subpoblaciones espermáticas con distintos patrones de movimiento que coexisten en la misma muestra de semen (Abaigar et al., 1999), lo cual es una visión más real que la motilidad media de la muestra, puesto que, un eyaculado está constituido por una población heterogénea de espermatozoides. Existen numerosas evidencias de la existencia de subpoblaciones espermáticas con patrones de movimiento específicos en eyaculados de varias especies de mamíferos (Quintero-Moreno et al., 2004). La presencia de estas subpoblaciones podría sugerir la existencia de alguna relación entre cambios en la estructura subpoblacional de una muestra de semen y su capacidad fecundante.

#### 3.4.2. Cambios a nivel de la membrana plasmática durante la capacitación

El aumento de pH intracelular durante la capacitación no sólo activa los canales CatSper, sino que también afecta drásticamente el potencial de membrana, produciendo una rápida hiperpolarización de la célula. Esta hiperpolarización en parte se debe a un aumento en la permeabilidad de los iones  $K^+$ . Mediante el uso de ratones knock-out para el canal de  $K^+$  denominado KCNU1 se estableció que KCNU1 es el principal canal de  $K^+$  en espermatozoides de ratón (Martínez-López et al., 2009). Los ratones knock-out para KCNU1 son infértiles y esto se debe a que los espermatozoides de estos ratones en condiciones capacitantes se encuentran despolarizados y su motilidad se ve afectada (Zeng et al., 2011).

Otro ion que tiene importantes funciones en las vías de señales que se generan durante la capacitación es el bicarbonato. A nivel de la membrana plasmática, el aumento de la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  produce una reorganización de los lípidos de la membrana, en el cual hay movilización de fosfolípidos entre la hemicapa interna y externa (Harrison y Gadella, 2005). Estos arreglos en la membrana inducen la pérdida de colesterol de la membrana plasmática (Flesch et al., 2001). En el tracto reproductor femenino, tanto albúmina como HDL son las responsables de captar el colesterol que efluye de la membrana, mientras que en condiciones *in vitro* el principal responsable es albúmina.

Durante la capacitación la membrana plasmática del espermatozoide también sufre otras alteraciones, en espermatozoides de bovinos se ha descrito la activación de fosfatidilinositol 4-quinasa (PI4K) y de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), enzimas implicadas en la producción de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) y fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), dos importantes fosfolípidos involucrados en varias vías de señales y que actúan en la producción de segundos mensajeros (Etkovitz et al., 2007).

### 3.4.3. Cambio en los estados de fosforilación durante la capacitación

Otro efecto que produce el ingreso de  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , es la activación de vías de señales responsables de los cambios en el estado de fosforilación de varias proteínas tanto en residuos de tirosina como en serina/treonina (Alnagar et al., 2010). El ingreso de  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$  producen la activación de la adenilato ciclasa soluble (sAC), la cual se encuentra presente en espermatozoides, con aumento en la producción de AMP cíclico (AMPc) (Visconti, 1998). El aumento de los niveles de AMPc activa la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) en espermatozoides de varias especies incluida la especie humana. La activación de esta quinasa está asociada con la fosforilación en residuos de tirosina que caracteriza la capacitación, sin embargo se desconoce el mecanismo por el cual ocurre dicha fosforilación. Se cree que la fosforilación en residuos de tirosina puede regular la actividad y localización de estas proteínas.

En la Figura 4 se muestran las vías de señales involucradas en la capacitación de espermatozoides.

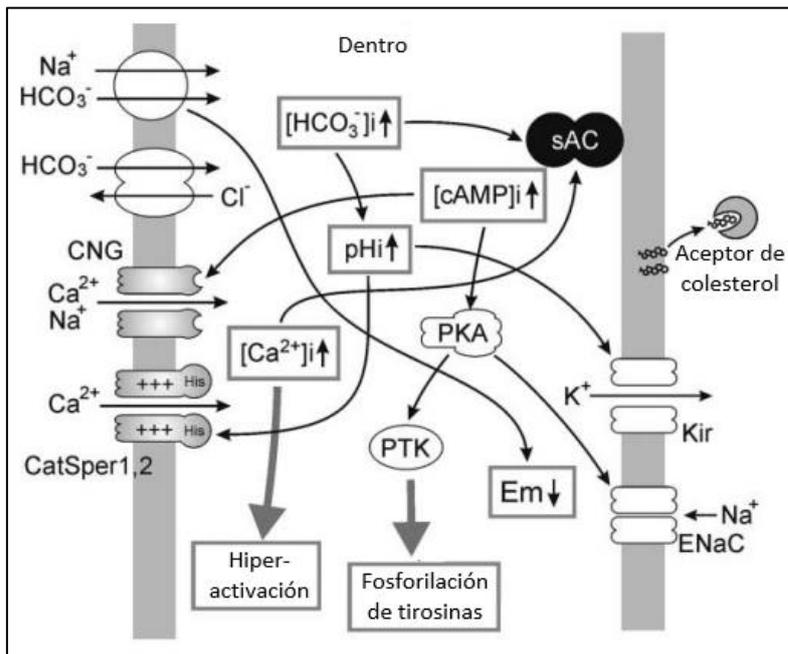


Figura 4. Esquema de las vías de señales involucradas en la capacitación de espermatozoides. Durante la capacitación los espermatozoides sufren cambios fundamentales para que esta célula adquiera la capacidad de fecundar al ovocito. Se ha demostrado que es fundamental la salida de colesterol desde la membrana plasmática, que requiere aceptores en el

medio capacitante. El ingreso de  $\text{HCO}_3^-$  activa la adenilato ciclasa soluble (sAC) con mayor producción de AMPc, éste activa PKA que desencadena la fosforilación de residuos de tirosina característica de la capacitación y participa de la hiperactivación del espermatozoide. Por otro lado también se produce el ingreso de calcio, el incremento en las concentraciones citoplasmáticas de este ión participa también de la activación de la sAC y la hiperactivación. El ingreso de  $\text{HCO}_3^-$  altera también el pH intracelular. Además la capacitación se caracteriza por una hiperpolarización debido a la salida de  $\text{K}^+$ . Este cambio en el potencial de membrana altera el estado de los canales de calcio voltaje dependientes cuya apertura durante la reacción acrosómica es fundamental. (Modificado de Darszon et al., 2006).

#### 3.4.4. Reacción acrosómica

La reacción acrosómica también conocida como excitosis acrosomal es un prerrequisito indispensable para la fecundación, ya que este proceso secretorio produce cambios morfológicos en el espermatozoide, permitiéndole atravesar la zona pelúcida y fecundar el ovocito (Yanagimachi, 1994) (Figura 6). La reacción acrosómica es una excitosis regulada dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y si bien comparte las moléculas básicas de fusión con cualquier otro tipo de excitosis, también presenta características particulares como: I) dado que en el espermatozoide no se produce reciclaje de membrana, la reacción acrosómica es un proceso irreversible que ocurre una única vez en la vida del espermatozoide; II) otra característica particular de este proceso exocítico

es que la fusión entre la membrana acrosomal externa, con la membrana plasmática ocurre en múltiples puntos; III) además de la liberación del contenido acrosomal, se produce la liberación de vesículas híbridas constituidas por membrana plasmática y membrana acrosomal externa (Tomes, 2007). Como resultado de la reacción acrosómica se pierde la membrana plasmática de la región acrosomal y también la membrana acrosomal externa excepto en la región ecuatorial, por lo que parte de la cabeza del espermatozoide queda recubierta sólo por la membrana acrosomal interna (Yanagimachi, 1994) (Figura 5).

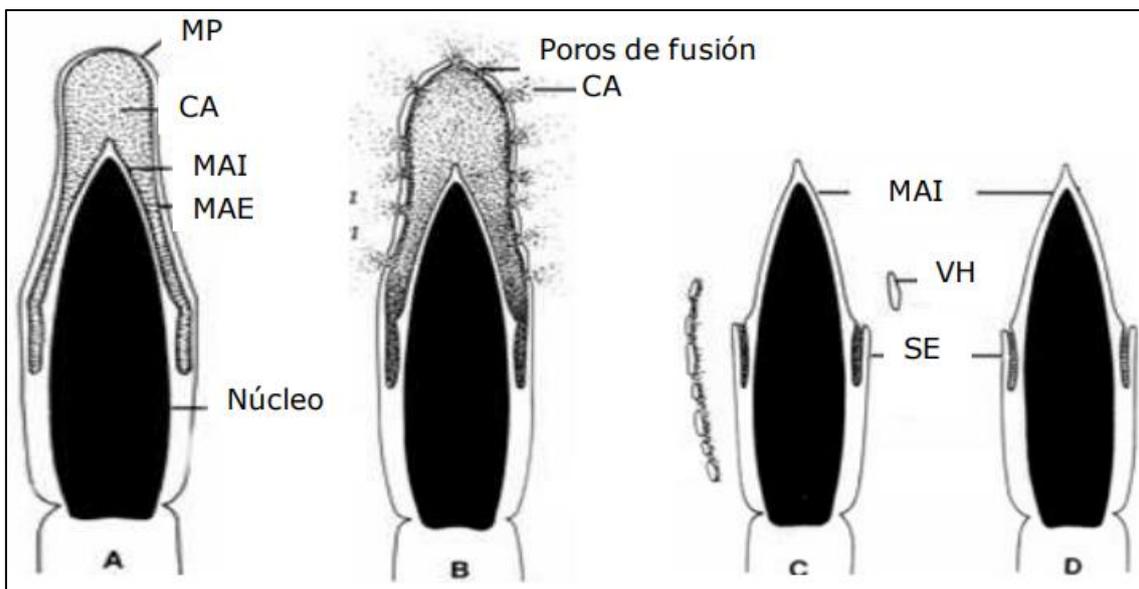


Figura 5: Esquema de la reacción acrosómica. (A) Los espermatozoides en reposo presentan la membrana acrosomal externa (MAE) paralela a la membrana plasmática (MP). (B) La estimulación desencadena la fusión de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática en múltiples puntos, con formación de poros a través de los cuales se libera el contenido acrosomal (CA). (C y D) La unión entre estas membranas produce vesículas híbridas (VH) que son también liberadas exponiendo así la membrana acrosomal interna (MAI). Cabe aclarar que el segmento ecuatorial (SE) se mantiene morfológicamente intacto. (Modificado de Yanagimachi, 1994).

Jin y colaboradores (Jin et al., 2011) han publicado datos de relevancia fisiológica en el campo de la fecundación, que han llevado a replantear dónde se inicia la reacción acrosómica y quién es el desencadenante de este proceso exocítico *in vivo* (Avella y Dean 2011). Haciendo uso de espermatozoides de ratón que expresan la proteína fluorescente verde (EGFP, del inglés Enhanced Green Fluorescence Protein) en su acrosoma y la proteína fluorescente roja (Ds-Red2) en la pieza media (Hasuwa et al., 2010) y mediante video microscopía se evaluó el estado del acrosoma antes y después

de contactar las células del cúmulo y la zona pelúcida. De esta manera se demostró que la reacción acrosómica en espermatozoides de ratón se inicia antes que el espermatozoide tome contacto con la zona pelúcida y que los espermatozoides que han iniciado este proceso exocítico atraviesan la zona pelúcida en menos tiempo que aquellos espermatozoides que contactan la zona pelúcida y no han iniciado la reacción acrosómica. Además un dato sorprendente es que aquellos espermatozoides que contactan la zona pelúcida sin haber sufrido la reacción acrosómica, raramente atraviesan la zona pelúcida. Si bien estos resultados cambian el panorama donde se inicia y quien desencadena la reacción acrosómica, a su vez reafirman que sólo aquellos espermatozoides reaccionados son capaces de atravesar la zona pelúcida y fecundar al ovocito, corroborando que este proceso exocítico es fundamental para que se lleve a cabo la fecundación.

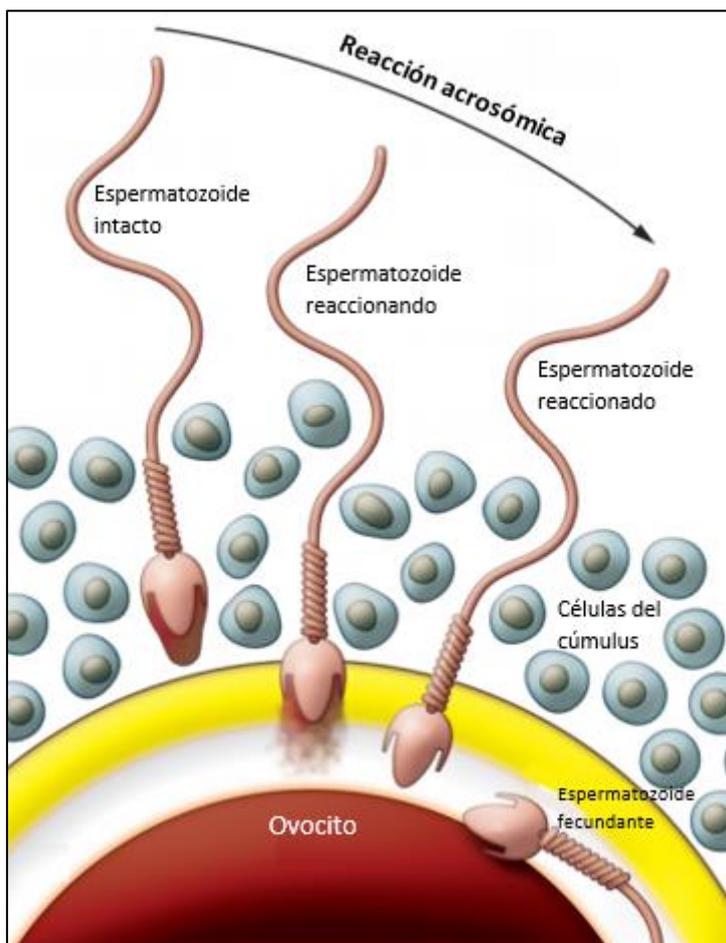


Figura 6: Modelo clásico de la reacción acrosómica. El proceso de reacción acrosómica es iniciado una vez que los espermatozoides capacitados contactan la zona pelúcida (ZP). Sólo los espermatozoides reaccionados pueden atravesar la zona pelúcida y fusionarse con el ovocito mediante el segmento ecuatorial. (Modificado de Ikawa et al., 2010).

#### 3.4.4.1. Evaluación de la reacción acrosómica

Se han propuesto varias técnicas para diferenciar el acrosoma intacto de los espermatozoides reaccionados con acrosomas, incluyendo la tinción citoquímica (Brum et al., 2006), inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos monoclonales (Sánchez et al., 1991), unión con lectinas fluoresceinadas (Kershaw-Young y Maxwell, 2011) y microscopía de contraste de fases para examinar la descondensación parcial de la cabeza (Silvestroni et al., 2004). En la actualidad, el uso de lectinas que unen los glicoconjugados de la membrana acrosómica externa o la matriz acrosómica ha sido uno de los más utilizados, tanto con la microscopía fluorescente (Kershaw-Young et al., 2013) como con la citometría de flujo (Cheuquemán et al., 2013). La tinción de FITC-PNA (Fluorescein isothiocyanate - Arachis hypogaea agglutinin) se ha utilizado para evaluar el estado acrosómico con microscopía. Se puede utilizar el FITC-PNA o FITC-PSA junto con otro fluorocromo, el yoduro de propidio (PI), para identificar espermatozoides reaccionados en vivo en muestras previamente fijadas. Muchos autores prefieren usar PNA porque presenta menos sitios de unión con espermatozoides cuando se compara con PSA (Graham, 2001). La presencia o ausencia del casquillo acrosómico ha sido evaluada en espermatozoides utilizando la tinción azul de Coomassie (Fumuso et al., 2014). Esta sencilla técnica es económica y puede ser evaluada mediante microscopía de luz, pero no permite evaluar la viabilidad de los espermatozoides, sólo evalúa la presencia o ausencia del capuchón acrosómico.

#### 3.5. Agentes capacitantes e inductores de la reacción acrosómica

En condiciones fisiológicas la capacitación espermática se produce en el tracto genital femenino, principalmente en el oviducto. El fluido del oviducto tiene la composición iónica adecuada donde además hay proteínas aceptoras de colesterol, como la albúmina y las lipoproteínas de alta densidad (HDL, del inglés High density lipoprotein) (Jha et al., 2008). A su vez, los espermatozoides también pueden ser capacitados *in vitro*. Si bien el contenido de los medios capacitantes para espermatozoide depende de la especie en estudio, en general  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y albúmina son los componentes esenciales para la capacitación en todas las especies (Visconti et al., 1998). Varios estudios han

demostrado que el  $\text{HCO}_3^-$  y el  $\text{Ca}^{2+}$  son necesarios para los procesos de movilización de iones y transducción de señales, mientras que la albúmina se requiere para que se produzca la salida de colesterol de la membrana plasmática de los espermatozoides.

Componente	Función	Resultado
<b>Bicarbonato (<math>\text{HCO}_3^-</math>)</b>	- Activa la vía de señalización de AC/AMPC/PKA y la remodelación de fosfolípidos.	-Incremento en la fluidez de la membrana
<b>Calcio (<math>\text{Ca}^{2+}</math>)</b>	- Ayuda a activar las vías de señalización de sAC/AMPC/PKA - Hiperpolarización de membrana.	-Fosforilación de proteínas, -Alcalinización del pH intracelular.
<b>Adenil Ciclasa soluble (sAC)</b>	- Elevación de los niveles de AMPC	-Segundo mensajero para la capacitación -Activa PKA
<b>Proteína Kinasa A</b>	- Fosforilación de la serina y treonina, conduce a la fosforilación de la tirosina, marcador bioquímico consistente para la capacitación.	-La fosforilación de la proteína tirosina puede regular la hiperactivación de la motilidad e incita a la reacción acrosómica. -Activa la PLD (fosfolipasa D)
<b>Fosfolipasa D</b>	- Polimerización de la Actina	-Formación de filamentos de Actina
<b>Albúmina</b>	- Flujo de colesterol	-Incremento de la fluidez de la membrana y transporte iónico -Posible redistribución de fosfolípidos y rafts lipídicos
<b>Glucosa</b>	- Energía por la vía glicolítica	-Producción de ATP
<b>Piruvato Lactato</b>	- Inhibidor de la glucosa para la capacitación espermática bovina	-Regenera $\text{NAD}^+$
<b>Péptido Promotor de la Fecundación (FPP)</b>	- Estimula la capacitación - Previene la reacción acrosómica espontánea	-Primer mensajero para la capacitación
<b>Adenosina Calcitonina Angiotensina II</b>	- Actúan por medio de la regulación de sAC/AMPC	-Posible participación de proteínas G
<b>Factor activador de Plaquetas (PAF)</b>	- Señales de transducción - Activación molecular	-Activación autocrina de la capacitación

Tabla 1. Componentes que intervienen en la capacitación del espermatozoide en mamíferos. (Modificado de Vadnais et al., 2007).

En cuanto a la reacción acrosómica, en general se asume que esta se inicia luego de que el espermatozoide se une a la zona pelúcida del ovocito (Florman y Storey, 1982). ZP3, una de las glicoproteínas que componen la zona pelúcida, es capaz de inducir la reacción acrosómica en espermatozoides de varias especies (Ganguly et al., 2010).

Otro agonista natural de la reacción acrosómica en varias especies es la progesterona la cual es secretada por las células del cúmulo (Thérien y Manjunath, 2003). La progesterona es capaz de inducir un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante los canales CatSper, disparando vías de señales que llevan a la exocitosis del gránulo acrosomal (Lishko et al., 2011). Además se ha demostrado que extractos celulares de las células del cúmulo y el ácido hialurónico (matriz donde se encuentran dispersas las células del cúmulo) induce o aumentan la reacción acrosómica (Hong et al., 2009).

Actualmente se conocen varios inductores que desencadenan el proceso de la reacción acrosómica *in vitro*, algunos de tipo farmacológico como el diacilglicerol (DAG) y sus análogos (ésteres de forbol como 12- miristato-13 acetato PMA), ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$  como A23187, análogos del AMPc como dbcAMP, mentol, etc. Estos inductores son capaces de desencadenar la reacción acrosómica por diferentes vías de señalización ya que se ha demostrado la presencia de receptores para estas moléculas en espermatozoides de mamíferos. Por otro lado también se sabe que los canales CatSper pueden ser activados por progesterona, prostaglandinas, diversos odorantes, mentol y análogos a nucleótidos cíclicos, por lo que los canales CatSper actuarían como un quimiosensor de varias moléculas y de esta manera integrar varias vías de señales que son esenciales para la reacción acrosómica (Brenker et al., 2012).

### 3.5.1. Papel del calcio en la capacitación

La participación del  $\text{Ca}^{2+}$  en la reacción acrosómica y en la hiperactivación se conoce desde hace mucho tiempo (Yanagimachi, 1994). La acción del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre distintas enzimas efectoras involucradas en la señal de transducción espermática sugiere que este catión juega un papel importante en la capacitación (Dragileva et al., 1999). En 1915, Loeb (Loeb, 1915) fue el primero en demostrar que se requiere  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular para que se produzca la fecundación en invertebrados. Una exigencia similar fue demostrada en espermatozoides de ratón (Iwamatsu y Chang, 1971). Desde entonces, muchos autores han mostrado la importancia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la fisiología espermática (Handrow et al., 1989; DasGupta et al., 1993; Fraser et al., 1995) y en la fosforilación de la tirosina de proteínas espermáticas (Visconti et al., 1995).

Una de las consecuencias más importante de la salida de colesterol de las membranas, es una masiva entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular que se considera requisito indispensable para que el proceso de reacción acrosómica tenga lugar (Flesch y Gadella, 2000). Esta entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser consecuencia de los cambios que ocurren en la fluidez de la membrana, lo que le confiere que sea más permeable al  $\text{Ca}^{2+}$ .

Visconti y Kopf en 1998, sugirieron un efecto cooperativo del  $\text{Ca}^{2+}$  y del  $\text{HCO}_3^-$  en la modulación de la capacitación espermática, es decir, es necesaria la presencia de ambos para que tenga lugar un incremento de los niveles de AMPc y la posterior fosforilación de diversas proteínas.

CatSper 1 y 2 son canales de calcio dependientes de voltaje que se encuentran localizados en la cola del espermatozoide. Espermatozoides de ratones deficientes en estos canales de calcio no presentan una hiperactivación durante la capacitación siendo incluso infértiles a pesar de presentar fosforilación de la tirosina (Carlson et al., 2003).

Otro aspecto que influye en la capacitación en relación con el  $\text{Ca}^{2+}$  es el pH intracelular. Espermatozoides no capacitados mantienen un pH intracelular acidificado (Parrish et al., 1989) actuando como un regulador del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Florman et al., 1992), previniendo la capacitación y la reacción acrosómica. El pH intracelular se convierte en más alcalino durante la capacitación (Vredenburg-Wilberg y Parrish, 1995).

### 3.5.2. Uso del ionóforo A23187

El ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  A23187 (a partir de ahora solo se denominará como ionóforo) (Figura 7), transporta  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a las células o libera  $\text{Ca}^{2+}$  de las reservas intracelulares (Reed y Lardy, 1972), induce un aumento de la respiración (Storey, 1975), la motilidad (Babcock et al., 1976) y la reacción acrosómica (Yanagimachi, 1975) en los espermatozoides de mamíferos.

Varios estudios han demostrado que el ionóforo aumenta excesivamente la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , haciendo que los espermatozoides sean inmóviles (Tateno y Mikamo, 1987). Sin embargo, los espermatozoides inmovilizados no están muertos, como lo demuestran Suárez y cols. (Suarez et al., 1987), quienes descubrieron



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Reactivos

Todos los reactivos en los que no se especifique lo contrario han sido adquiridos a Sigma-Aldrich (Missouri, EE. UU.).

### 4.2. Animales

Todos los animales utilizados en el desarrollo de este trabajo fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y con ciclos de 14 h de luz y 10 h de oscuridad, y se les dio libre acceso a agua y comida. Todos los procedimientos experimentales con ratones fueron aprobados por la Junta de Revisión Institucional del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), con el número de permiso CEEA 2014/025, y se llevaron a cabo de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio avalado por la Sociedad para el Estudio de la Reproducción y la legislación europea (directiva 86/609/EEC). Los animales para todos los experimentos se sacrificaron por dislocación cervical evitando al máximo el sufrimiento del animal.

### 4.3. Espermatozoides

#### 4.3.1. Ratón

Los espermatozoides se obtuvieron de epidídimos de machos de la línea B6D2F1 de fertilidad probada mediante cruces programados. El sacrificio se realizó por dislocación cervical y se extrajo la cola del epidídimo y parte del conducto deferente a una placa de 35 mm de diámetro con medio M2 (Anexo 9.1.1.). Bajo una lupa se procedió a limpiar la mayor cantidad de grasa y a retirar el vaso sanguíneo que acompaña al conducto deferente. Posteriormente, se transfirieron la cola del epidídimo y el conducto deferente a una gota de 500  $\mu\text{l}$  de HTF (Anexo 9.1.2.) cubierta de aceite mineral que previamente se había mantenido toda la noche a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ .

Bajo la lupa y utilizando unas pinzas de punta fina, se sacaron los espermatozoides por el conducto deferente mediante pequeñas presiones a lo largo del conducto. Tras retirar tanto la cola del epidídimo como el conducto deferente los espermatozoides se incubaron durante 15 minutos a 37 °C en una atmósfera saturada de humedad con 5% de CO<sub>2</sub> en aire para facilitar su dispersión. Pasado este tiempo, se realizó el cálculo de la concentración bajo un microscopio de campo claro utilizando una cámara Thoma. Se determinó la concentración de espermatozoides y se ajustó a una concentración de entre 8x10<sup>6</sup> y 10x10<sup>6</sup> espermatozoides/ml para su tratamiento con el ionóforo de Ca<sup>2+</sup> A23187 (a partir de ahora solo se denominará como ionóforo). El ajuste de la concentración de espermatozoides se realizó diluyendo con medio de fecundación HTF (Anexo 9.1.2.).

#### 4.3.2. Toro

Se utilizaron pajuelas de semen congeladas (0,25 ml) de un solo toro del Valle Asturiano (Toro Somedano IA-2-25-120 Asturiana V). Las pajuelas se descongelaron en un baño de agua a 37 °C durante un minuto. El semen descongelado se centrifugó durante 10 minutos en un gradiente de 1 ml de Bovipure<sup>®</sup> al 40% y 1 ml de Bovipure<sup>®</sup> al 80% según las instrucciones del fabricante (Nidacon Laboratories AB, Gotemburgo, Suecia). El pellet de espermatozoides fue aislado y se lavó en 3ml de Boviwash<sup>®</sup> (Nidacon Laboratories AB) por centrifugación a 280 x g durante 5 minutos. El pellet fue resuspendido en 300 µl restantes de Boviwash<sup>®</sup>. Se determinó la concentración de espermatozoides y se ajustó a una concentración de entre 6x10<sup>6</sup> y 8x10<sup>6</sup> espermatozoides/ml para su tratamiento con el ionóforo. El ajuste de la concentración de espermatozoides se realizó diluyendo con medio de fecundación FERT-TALP (Anexo 9.2.1.).

### 4.4. Tratamiento con el ionóforo A23187

#### 4.4.1. Ratón

La suspensión de espermatozoides fue dividida en cinco alícuotas de 250 µl cada una en microtubos de 1,5ml. La alícuota 1 (control negativo) fue diluida con 250 µl adicionales de HTF sin DMSO ni ionóforo, la 2 con 250 µl de HTF con DMSO al 0,4% (control DMSO,

concentración final de 0,2%), la 3, 4 y 5 con 250  $\mu$ l de HTF con ionóforo a una concentración de 2, 10 y 20  $\mu$ M (concentración final de 1, 5 y 10  $\mu$ M respectivamente). Todas las alícuotas con ionóforo contuvieron una concentración final de DMSO de 0,2% al ser el solvente en el que se almacena el stock de ionóforo. Las cinco suspensiones de espermatozoides se incubaron a 37 °C durante 10 minutos. Después de 10 minutos de incubación, los espermatozoides se lavaron mediante dos centrifugaciones (la primera a 500 x g por 5 minutos y la segunda a 300 x g por 5 minutos) en medio HTF libre de ionóforo. El pellet fue resuspendido en 100  $\mu$ l de medio HTF sin ionóforo. Se determinó la concentración de espermatozoides y diluyeron en medio HTF a una concentración de  $2 \times 10^6$  espermatozoides/ml para su análisis de motilidad y/o de reacción acrosómica. También se utilizaron diluciones a  $2,5 \times 10^6$  y  $0,25 \times 10^6$  espermatozoides/ml para evaluar su capacidad fecundante mediante fecundación *in vitro* (FIV).

#### 4.4.2. Toro

La suspensión de espermatozoides fue dividida en cinco alícuotas de 250  $\mu$ l cada una en microtubos de 1,5 ml. La alícuota 1 (control LAB) y 2 (control negativo) fueron diluidas con 250  $\mu$ l adicionales de FERT-TALP libre de DMSO e ionóforo, la 3 con 250  $\mu$ l de FERT-TALP con DMSO al 0,4% (control DMSO, concentración final de 0,2%), la 4 y 5 con 250  $\mu$ l de FERT-TALP con ionóforo a una concentración de 0,6 y 10  $\mu$ M (concentración final de 0,3 y 5  $\mu$ M respectivamente). Todas las alícuotas con ionóforo contuvieron una concentración final de DMSO de 0,2% al ser el solvente en el que se almacena el stock de ionóforo. Los espermatozoides del control LAB se usaron para evaluar su capacidad fecundante en ese mismo momento tal como se haría en una FIV convencional de rutina. Las suspensiones de espermatozoides 2, 3, 4 y 5 se incubaron a 37 °C por 10 minutos. Después de 10 minutos de incubación, los espermatozoides se lavaron mediante dos centrifugaciones (la primera a 500 x g por 5 minutos y la segunda a 300 x g por 5 minutos) en medio FERT-TALP. El pellet final fue resuspendido en 100  $\mu$ l de medio FERT-TALP. Se determinó la concentración de espermatozoides y se disolvió en FERT-TALP a una concentración de  $2 \times 10^6$  espermatozoides/ml para analizar la reacción acrosómica. Otra parte se ajustó también en FERT-TALP a una concentración de  $2 \times 10^6$  y  $0,126 \times 10^6$  espermatozoides/ml para evaluar su capacidad fecundante mediante FIV.

#### 4.5. Análisis de la motilidad

Se analizó la motilidad antes del tratamiento con el ionóforo (tiempo cero) y pasados 30 minutos de haber finalizado el tratamiento con el ionóforo. El análisis se realizó colocando 20  $\mu\text{l}$  de suspensión de espermatozoides en un portaobjetos precalentado en una platina calefactora a 37°C y acoplada a un microscopio Nikon Eclipse 50i (Nikon, Tokio, Japón) equipado con una cámara digital Basler A312f (Basler AG, Ahrensburg, Alemania) capaz de grabar 25 fotogramas/s. En cada repetición se grabaron cinco vídeos de 1s (20-50 espermatozoides en movimiento) en diferentes campos de la parte superior de la gota y se analizaron utilizando el Sistema Integrado de Análisis de Semen (ISAS; Projectes i ServeisR+D S.L., Valencia, España). En cada experimento, se establecieron tres réplicas para cada condición/tratamiento. Los parámetros analizados fueron los descritos por Mortimer *et al.* (2000) (Figura 8):

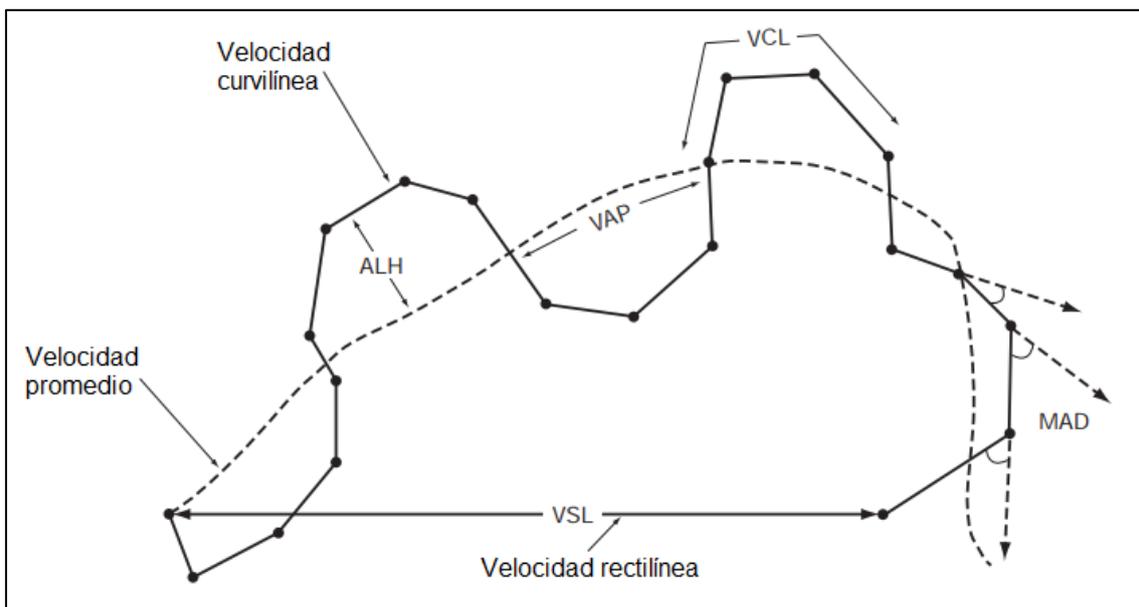


Figura 8. Terminología estándar para variables medidas por sistemas CASA. Modificado de (World Health Organization [WHO], 2010).

- VCL (velocidad curvilínea): se determina a partir de la distancia total recorrida por la cabeza del espermatozoide en toda su trayectoria. Se expresa en  $\mu\text{m/s}$ .
- VSL (velocidad rectilínea): se determina a partir de la distancia en línea recta recorrida por la cabeza del espermatozoide desde el primer punto hasta el último punto de su trayectoria. Se expresa en  $\mu\text{m/s}$ .

- VAP (velocidad media): se determina a partir de la distancia recorrida por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria media de circulación. Se expresa en  $\mu\text{m/s}$ .
- LIN (índice de linealidad): relación porcentual entre la velocidad rectilínea y la velocidad curvilínea  $\%LIN = (VSL/VCL) \times 100$ .
- STR (índice de rectitud): relación porcentual entre la velocidad rectilínea y la velocidad media  $\%STR = (VSL/VAP) \times 100$ .
- WOB (índice de oscilación): relación porcentual entre la velocidad media y la velocidad rectilínea  $\%WOB = (VAP/VCL) \times 100$ .
- ALH (amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide): anchura del movimiento lateral de la cabeza del espermatozoide. Expresado en  $\mu\text{m}$ .
- BCF (frecuencia de batido): frecuencia de cortes de la línea de trayectoria por la cabeza del espermatozoide. Expresado en Hz.

#### 4.6. Análisis de la reacción acrosómica

De cada suspensión de espermatozoides (de cada condición/tratamiento) se realizó un frotis con 20  $\mu\text{l}$  sobre un portaobjetos de vidrio para microscopio y se secaron con ayuda de una placa calefactora (37°C) durante 10 minutos. A continuación, los portaobjetos se sumergieron en metanol absoluto durante 30 segundos, se secaron al aire y se enjuagaron en PBS (Anexo 9.1.3.) dos veces durante 5 minutos antes de la incubación con PNA-FITC-Hoechst (PNA-FITC diluido a una concentración de 15  $\mu\text{g/ml}$  en solución Hoechst a 0.005 mg/ml en  $\text{H}_2\text{O}$ ) en una caja húmeda durante 30 min. Finalmente, los portaobjetos se lavaron con agua destilada durante 15 minutos y se montaron con un medio de montaje acuoso (Fluoromount G; EMS, Hatfield, PA, EE. UU.). Las preparaciones se examinaron en un microscopio de fluorescencia Nikon Optiphot-2, objetivo 40x, con los filtros UV-2A (rango de excitación 330 – 380 nm) y B-2A (rango de excitación 450 - 490 nm) y se contó el número de espermatozoides con acrosoma reaccionado y acrosoma no reaccionado (Figura 9) moviéndose aleatoriamente a través de diferentes campos del portaobjetos (contando 100 células por portaobjetos).

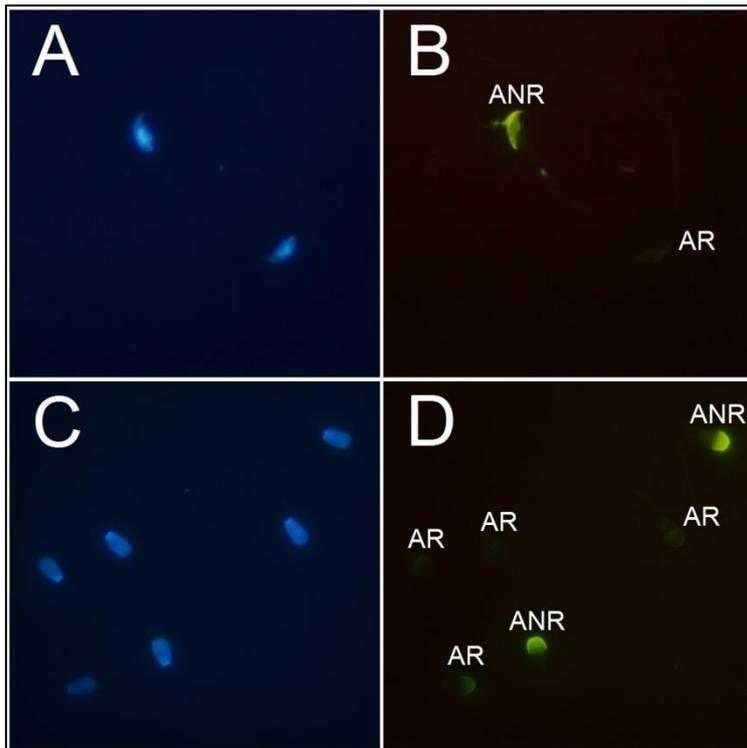


Figura 9. (A y C) Localización de núcleos (Hoechst 33258, azul) en espermatozoides de ratón y toro respectivamente. (B y D) Acrosomas teñidos con FITC-PNA: ANR (Acrosoma no reaccionado) y AR (Acrosoma reaccionado).

Se consideraron como espermatozoides reaccionados aquellos que no presentaban fluorescencia, o que solo la presentaban en la región ecuatorial o en forma de nebulosa y como espermatozoides intactos, a aquellos que presentaron todo el acrosoma fluorescente. Para cada condición/tratamiento, se realizaron experimentos por duplicado utilizando tres muestras de espermatozoides de tres animales diferentes en el caso de ratón, y de 6 pajuelas (2 por cada experimento) de semen congelado en el caso de toro.

#### 4.7. Evaluación de la capacidad fecundante: producción *in vitro* de blastocistos murinos

##### 4.7.1. Obtención de ovocitos

Se superovularon hembras de 8-10 semanas de edad para tener una cantidad suficiente de complejos cumulo-ovocito (CCOs) mediante recuperación ovárica. Para la superovulación primero se inyectaron 7.5UI en 0,1ml de suero fisiológico de la hormona gonadotropina coriónica equina (PMSG; Folligon®, Intervet, Salamanca, España) y tras 48h se inyectaron 7.5UI en 0,1ml de suero fisiológico de gonadotropina coriónica humana (hCG; VeterinCorion®, Divarsa, Barcelona, España).

Para obtener los COCs de las hembras superovuladas, éstas se sacrificaron por dislocación cervical 14 h después de la administración de la hCG. Se realizó una laparotomía mediante incisión en forma de "V" desde el abdomen inferior extendiéndose hacia los laterales del diafragma, con el fin de exponer todos los órganos de la cavidad peritoneal. Los oviductos se extrajeron realizando un corte entre el ovario y el infundíbulo, y entre la parte caudal del oviducto y la parte craneal del cuerno uterino, y se colocaron en placas de 35 mm de diámetro con medio M2. Con ayuda de una aguja 30 G se realizó la punción del ápula para recuperar los COCs.

#### 4.7.2. Fecundación *in vitro* (FIV)

La FIV se realizó siguiendo el método descrito por Martín-Coello y colaboradores (2008) con algunas modificaciones. Se utilizó el medio HTF suplementado con 2 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA), tanto para la preparación del semen como para la co-incubación de los gametos (Quinn et al., 1985).

Los ovocitos maduros se lavaron en el medio de fecundación y a continuación se transfirieron a placas de 4 pocillos (cada pocillo 15mm de diámetro y 9,5mm de profundidad) con 300 µl de medio/pocillo, en proporción de 35 ovocitos/pocillo. Suspensiones de  $2.5 \times 10^6$  y  $0.250 \times 10^6$  espermatozoides/ml se utilizaron para realizar la inseminación. Las concentraciones finales de  $1 \times 10^6$  y  $0.1 \times 10^6$  espermatozoides/ml se obtuvieron agregando 200 µl de la suspensión a cada pocillo. El periodo de co-incubación de ambos gametos fue de 4 horas a 37 °C en atmósfera saturada de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.7.3. Cultivo *in vitro* (CIV)

Después de cumplir el periodo requerido para la fecundación, los presuntos cigotos se recogieron cuidadosamente y se transfirieron a una placa de 35 mm con medio HTF donde se eliminaron las células del cúmulo y los espermatozoides adheridos a la zona pelúcida mecánicamente mediante pipeteo. Finalmente, los cigotos se lavaron dos veces en medio HTF y una vez en medio optimizado simple de potasio (KSOM+aa; Global®, LifeGlobal Group, Guilford, EE. UU.), antes de ponerlos en cultivo en gotas de 25 µl de

medio KSOM+aa. Los embriones se cultivaron durante 4 días y se evaluó la tasa de división en el día 1, 24h después de la fecundación (24 hpf), y la tasa de blastocistos en día 4, (96-100 hpf).

#### 4.8. Evaluación de la capacidad fecundante: producción *in vitro* de blastocistos bovinos

##### 4.8.1. Recolección de ovocitos

La recuperación de los ovocitos se realizó mediante la aspiración de los folículos ováricos de 2-8 mm de diámetro, usando una jeringa y una aguja hipodérmica (18 G). El líquido folicular se depositó en un tubo de 50 ml a 38,5 °C. Tras la decantación de los ovocitos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado de ovocitos resultante se diluyó con PBS (Anexo 9.2.3.), para después depositarlo en placas Petri donde se llevó a cabo la selección ovocitaria.

La selección de los ovocitos se basó en la evaluación visual de las características morfológicas reportadas anteriormente (Leibfried y First, 1989; de Loos et al., 1989). Se escogieron únicamente ovocitos que poseían más de 4 capas de células del cúmulo, completas y compactas (Grado 1), y ovocitos más oscuros en su zona perimetral, con 1-3 capas de células del cúmulo (Grado 2). La evaluación visual se llevó a cabo mediante una lupa estereoscópica (Nikon® SMZ-1500). Los ovocitos seleccionados se lavaron 3 veces en PBS a 38,5 °C para eliminar restos celulares, y dos veces en medio de maduración, previamente equilibrado en incubadora a 38,5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad saturada.

##### 4.8.2. Maduración *in vitro* (MIV)

Para la maduración de los ovocitos, se utilizó un medio compuesto por M199 (Sigma, Poole, Dorset, Reino Unido) suplementado con suero fetal bovino (FCS; Sigma-Aldrich) al 10% y 10 ng/ml de “epidermal growth factor” (EGF; Sigma, Poole, Dorset, Reino Unido). La maduración se desarrolló en placas de 4 pocillos (Nunc Inc., Roskilde, Dinamarca) con 500 µl de medio en cada pocillo, en proporción de 35 ovocitos/pocillo.

Los ovocitos se mantuvieron en maduración durante 22-24 horas, en incubadora a 38,5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad saturada.

#### 4.8.3. Fecundación *in vitro* (FIV)

La fecundación de los ovocitos madurados se realizó en el medio FIV, con la siguiente composición: medio Tyrode compuesto por bicarbonato sódico 25 mM, piruvato sódico 1 mM, albúmina sérica bovina (BSA) (sin ácidos grasos) 6 mg/ml, de lactato sódico 22 mM y sales de heparina sódica (184 unidades/mg) 10 µg/ml (Calbiochem, San Diego, CA). Los ovocitos maduros se lavaron en el medio de fecundación y a continuación se transfirieron a placas de 4 pocillos con 250 µl de medio, en proporción de 35 ovocitos/pocillo.

Suspensiones de  $2 \times 10^6$  y  $0.126 \times 10^6$  espermatozoides/ml se utilizaron para realizar la inseminación. Las concentraciones finales de  $1 \times 10^6$  y  $0.063 \times 10^6$  espermatozoides/ml se obtuvieron agregando 250 µl de la suspensión a cada pocillo. Los ovocitos se cocultivaron con la correspondiente dilución espermática durante 18-22 horas en la incubadora, a 38,5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad saturada.

#### 4.8.4. Cultivo *in vitro* (CIV)

Los presuntos cigotos fueron desnudados de las células del cúmulo mediante agitación con vórtex durante 3 min. A continuación se lavaron cuatro veces en PBS y dos veces en medio de cultivo (Sintetic Oviductal Fluid (SOF) + 5% FCS) (Anexo 9.2.2.). El cultivo se realizó en un sistema de microgotas de 25 µl de este mismo medio de cultivo cubiertas por aceite mineral, en proporción de 1 embrión/µl. Los embriones se mantuvieron en la incubadora a 38,5 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub>, y humedad saturada durante todo su desarrollo, hasta el día 10 (día 0= día de la fecundación).

### 4.9. Estadística

Todas las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el paquete de software SPSS Statistics 22.0 para Windows (IBM, Armonk, NY, EE. UU.). Los resultados se presentan

en forma de medias  $\pm$  error estándar de la media. Las medias se compararon y analizaron mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba post hoc de Tukey. La significación se estableció en  $P < 0,05$  para el análisis de motilidad y capacidad fecundante y en  $P < 0,01$  para el análisis de reacción acrosómica.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Ratón

#### 5.1.1. Análisis de la motilidad mediante CASA

Las alícuotas tratadas con 5 y 10  $\mu\text{M}$  de ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  A23187 (a partir de ahora solo se denominará como ionóforo) presentaron un mayor porcentaje de espermatozoides motiles comparando con los controles y con el tratamiento de 1  $\mu\text{M}$  (Tabla 2). Así mismo la progresividad del movimiento se vio disminuida en esas mismas alícuotas reflejado como una menor VSL, LIN y STR (Tabla 2). Además la frecuencia de batido (BCF) fue también en las alícuotas tratadas con 5 y 10  $\mu\text{M}$  de ionóforo en relación al resto de condiciones (Tabla 2).

	Tiempo 0	Control	Ionóforo 1 $\mu\text{M}$	Ionóforo 5 $\mu\text{M}$	Ionóforo 10 $\mu\text{M}$
<b>Motiles (%)</b>	51 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	30 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	30 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	55 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	62 $\pm$ 2 <sup>a</sup>
<b>VCL (<math>\mu\text{m/s}</math>)</b>	218 $\pm$ 4	213 $\pm$ 4	201 $\pm$ 16	221 $\pm$ 14	216 $\pm$ 15
<b>VSL (<math>\mu\text{m/s}</math>)</b>	70 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	67 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	60 $\pm$ 11 <sup>a</sup>	43 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	37 $\pm$ 2 <sup>b</sup>
<b>VAP (<math>\mu\text{m/s}</math>)</b>	102 $\pm$ 2	98 $\pm$ 3	100 $\pm$ 7	118 $\pm$ 7	120 $\pm$ 5
<b>LIN (%)</b>	32 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	32 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	30 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	21 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	18 $\pm$ 2 <sup>b</sup>
<b>STR (%)</b>	68 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	68 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	60 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	39 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	32 $\pm$ 2 <sup>b</sup>
<b>WOB (%)</b>	47 $\pm$ 1	47 $\pm$ 1	50 $\pm$ 2	53 $\pm$ 3	56 $\pm$ 3
<b>ALH (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	10,7 $\pm$ 0,2	10,4 $\pm$ 0,2	10 $\pm$ 0,9	11 $\pm$ 0,9	11 $\pm$ 0,9
<b>BCF (Hz)</b>	5,3 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	5 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	4,4 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	3,9 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	3,9 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>

Tabla 2. Análisis de la motilidad mediante CASA de espermatozoides de ratón tratados con el ionóforo de calcio A23187. Tiempo 0: la muestra recién extraída; Control: alícuota procesada en paralelo al tratamiento con ionóforo. Datos expresados como Media  $\pm$  error estándar ( $n=3$ , determinaciones por réplica=3). Las diferentes letras indican diferencias significativas de acuerdo a la ANOVA de dos vías ( $P<0,05$ ).

#### 5.1.2. Análisis de la reacción acrosómica

Todas las concentraciones de ionóforo utilizadas indujeron la reacción acrosómica (Figura 10). La concentración de 5 y 10  $\mu\text{M}$  de ionóforo presentaron el porcentaje más alto de espermatozoides con acrosoma reaccionado (74 y 79% respectivamente) (Figura 10).

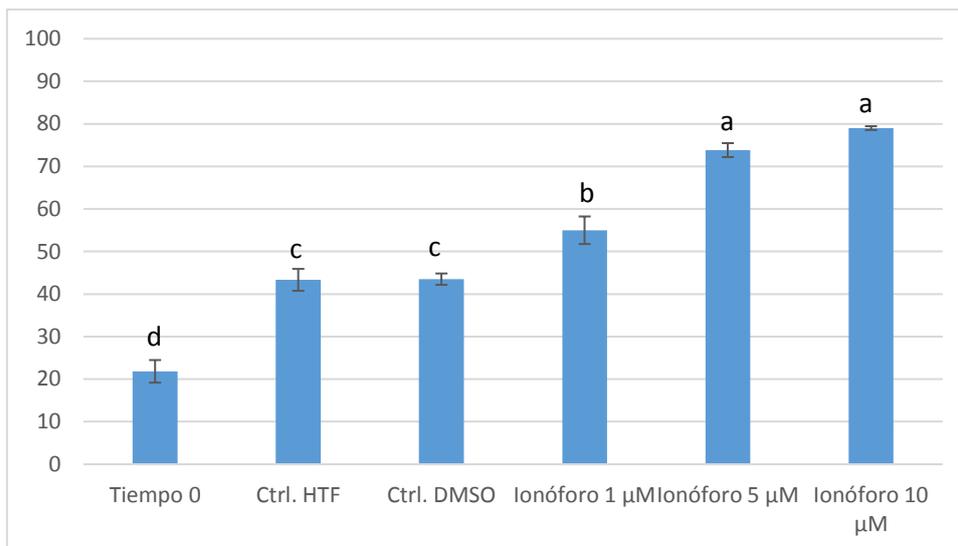


Figura 10. Análisis de la reacción acrosómica en espermatozoides de ratón tratados con el ionóforo de calcio A23187. Tiempo 0: la muestra recién extraída; Control: alícuota procesada en paralelo al tratamiento con ionóforo; Control DMSO: alícuota alícuota procesada en paralelo al tratamiento con ionóforo tratada con DMSO (solvente utilizado con el ionóforo) a concentración equivalente a los tratamientos con el ionóforo. Datos expresados como Media  $\pm$  error estándar ( $n=3$ , determinaciones por réplica=3). Las diferentes letras indican diferencias significativas de acuerdo a la ANOVA de dos vías ( $P<0,01$ ).

### 5.1.3. Evaluación de la capacidad fecundante mediante fecundación *in vitro*.

Observamos una relación directa de la concentración de espermatozoides utilizados en la FIV con el porcentaje de divisiones a dos células (Tabla 3). No se observaron diferencias significativas en cuanto a porcentaje de los divididos que llegaron a blastocistos en condiciones de cultivo *in vitro*.

Concentración espermática (espermatozoides/ml)	n	Divididos (%)	Blastocistos (%)
$1 \times 10^6$	17	$87 \pm 2^a$	$90 \pm 3^a$
$2 \times 10^5$	3	$84 \pm 4^a$	$85 \pm 5^a$
$1 \times 10^5$	10	$78 \pm 6^{ab}$	$80 \pm 8^{ab}$
$2 \times 10^4$	5	$66 \pm 9^{ab}$	$76 \pm 9^{ab}$
$1 \times 10^4$	7	$55 \pm 5^{bc}$	$74 \pm 7^{ab}$
$5 \times 10^3$	3	$31 \pm 9^c$	$54 \pm 23^b$

Tabla 3. Efecto de la concentración espermática sobre la eficiencia de la fecundación *in vitro* expresado en % de embriones divididos a 2 células y % de embriones que bajo condiciones de cultivo *in vitro* llegaron al estadio de blastocisto (en relación a los divididos). Datos expresados como Media  $\pm$  error estándar ( $n =$

número de réplicas, 29 a 31 ovocitos por réplica). Las diferentes letras indican diferencias significativas de acuerdo a la ANOVA de dos vías ( $P < 0,05$ ).

Utilizando la concentraciones de espermatozoides estándar para la FIV ( $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml) el ionóforo no afectó al porcentaje de embriones divididos o al porcentaje de embriones que llegaron a blastocisto (Tablas 4, 5 y 6). Cuando se usó ionóforo a una concentraciones de 1 o 10  $\mu\text{M}$  en la concentración subóptima de espermatozoides ( $1 \times 10^5$  spz/ml) (Tabla 4 y 6) no observamos efecto sobre la división o el desarrollo a blastocisto con respecto al control.

Tratamiento		n	Divididos (%)	Blastocistos (%)
$1 \times 10^6$ spz/ml	Control	3	$89 \pm 3$	$86 \pm 5$
	Ionóforo 1 $\mu\text{M}$	3	$80 \pm 4$	$87 \pm 5$
$1 \times 10^5$ spz/ml	Control	3	$86 \pm 7$	$55 \pm 21$
	Ionóforo 1 $\mu\text{M}$	3	$73 \pm 17$	$62 \pm 1$

Tabla 4. Efecto del ionóforo a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  sobre la eficiencia de la fecundación *in vitro* expresado en % de embriones divididos a 2 células y % de embriones divididos que bajo condiciones de cultivo *in vitro* llegaron al estadio de blastocisto. Datos expresados como Media  $\pm$  error estándar (n = número de réplicas, 35 a 39 ovocitos por réplica).

Cuando se usó ionóforo a una concentración de 5  $\mu\text{M}$  en la concentración subóptima de espermatozoides ( $1 \times 10^5$  spz/ml) (Tabla 5) se vio que el porcentaje de divididos fue superior al grupo control con concentración subóptima.

Tratamiento		n	Divididos (%)	Blastocistos (%)
$1 \times 10^6$ spz/ml	Control	4	$80 \pm 3^a$	$88 \pm 5$
	Ionóforo 5 $\mu\text{M}$	4	$77 \pm 7^a$	$84 \pm 4$
$1 \times 10^5$ spz/ml	Control	4	$49 \pm 3^b$	$80 \pm 16$
	Ionóforo 5 $\mu\text{M}$	4	$68 \pm 4^a$	$93 \pm 3$

Tabla 5. Efecto del ionóforo a una concentración de 5  $\mu\text{M}$  sobre sobre la eficiencia de la fecundación *in vitro* expresado en % de embriones divididos a 2 células y % de embriones divididos que bajo condiciones de cultivo *in vitro* llegaron al estadio de blastocisto. Datos expresados como Media  $\pm$  error estándar (n = número de réplicas, 22 a 26 ovocitos por réplica). Las diferentes letras indican diferencias significativas de acuerdo a la ANOVA de dos vías ( $P < 0,05$ ).

Tratamiento		n	Divididos (%)	Blastocistos (%)
<b>1 x 10<sup>6</sup> spz/ml</b>	Control	3	82 ± 6	96 ± 2
	Ionóforo 10 µM	3	66 ± 7	94 ± 4
<b>1 x 10<sup>5</sup> spz/ml</b>	Control	3	54 ± 13	85 ± 8
	Ionóforo 10 µM	3	46 ± 15	82 ± 11

Tabla 6. Efecto del ionóforo a una concentración de 10 µM sobre la eficiencia de la fecundación *in vitro* expresado en % de embriones divididos a 2 células y % de embriones divididos que bajo condiciones de cultivo *in vitro* llegaron al estadio de blastocisto. Datos expresados como Media ± error estándar (n = número de réplicas, 30 a 38 ovocitos por réplica).

## 5.2. Toro

### 5.2.1. Análisis de la reacción acrosómica

Todos los tratamientos analizados mostraron el mismo nivel de reacción acrosómica de los espermatozoides (Figura 11).

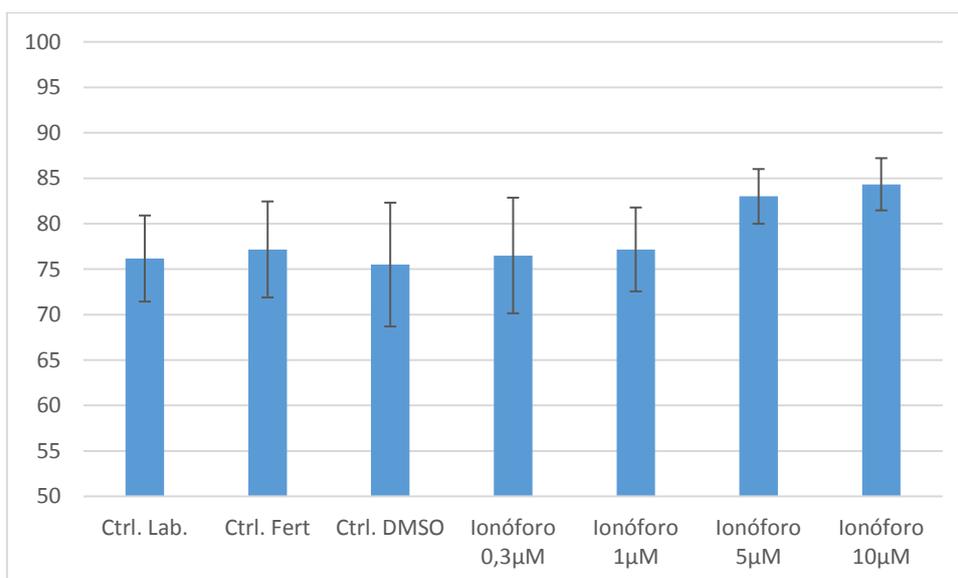


Figura 11. Análisis de la reacción acrosómica en espermatozoides de toro criopreservados tratados con el ionóforo de calcio A23187. Control Lab: alícuota sin ser procesada; Control Fert: alícuota procesada en paralelo al tratamiento con ionóforo. Control DMSO: alícuota procesada en paralelo al tratamiento con ionóforo tratada con DMSO (solvente utilizado con el ionóforo) a concentración equivalente a los tratamientos con el ionóforo. Datos expresados como Media ± error estándar (n=6).

### 5.2.1. Evaluación de la capacidad fecundante mediante fecundación *in vitro*

La utilización de una concentración de espermatozoides de  $63 \times 10^3$  espermatozoides/mL disminuyó el porcentaje de embriones en dos células (dividido) con respecto a la concentración estándar de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL (Tabla 7). El tratamiento con  $5 \mu\text{M}$  de ionóforo disminuyó el porcentaje de divididos utilizando  $1 \times 10^3$ . Esta misma concentración de ionóforo disminuyó el porcentaje de blastocistos cuando se utilizaron  $60 \times 10^3$  espermatozoides/ml (Tabla 7). El tratamiento con  $0,3 \mu\text{M}$  no tuvo ningún efecto ni en porcentaje de divididos ni en blastocistos producidos.

Condición / Tratamiento	Spz/ml	n	Divididos (%)	Blastocistos (%)
<b>Ctrl. Lab.</b>	$1 \times 10^6$	5	$78 \pm 1^a$	$35 \pm 2^a$
	$63 \times 10^3$	5	$54 \pm 6^b$	$19 \pm 8^a$
<b>Ctrl. Fert</b>	$1 \times 10^6$	5	$83 \pm 4^a$	$39 \pm 2^a$
	$63 \times 10^3$	5	$55 \pm 6^b$	$19 \pm 7^a$
<b>Ctrl. DMSO</b>	$1 \times 10^6$	5	$80 \pm 5^a$	$27 \pm 3^a$
	$63 \times 10^3$	5	$47 \pm 10^b$	$25 \pm 10^a$
<b>Ionóforo <math>0,3 \mu\text{M}</math></b>	$1 \times 10^6$	5	$69 \pm 4^{ab}$	$25 \pm 6^a$
	$63 \times 10^3$	5	$47 \pm 6^b$	$20 \pm 6^a$
<b>Ionóforo <math>5 \mu\text{M}</math></b>	$1 \times 10^6$	4	$57 \pm 6^b$	$21 \pm 6^a$
	$63 \times 10^3$	4	$52 \pm 5^b$	$6 \pm 3^b$

Tabla 7. Evaluación de la capacidad fecundante en toro. Efecto del ionóforo a concentración de  $0,3 \mu\text{M}$  y de  $5 \mu\text{M}$  sobre la eficiencia de la fecundación *in vitro* expresado en % de embriones divididos a 2 células y % de embriones divididos que bajo condiciones de cultivo *in vitro* llegaron al estadio de blastocisto. Datos expresados como Media  $\pm$  error estándar (n = número de réplicas, 24 a 25 ovocitos por réplica).

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. Análisis objetivo de la motilidad en ratón

Nuestra observación sobre la inhibición total de la motilidad de los espermatozoides de ratón y de toro por parte del ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  A23187 (a partir de ahora solo se denominará como ionóforo) ha sido reportada con anterioridad por otros autores. Tateno y col. (2013) demostraron que la inmovilización de los espermatozoides de ratón mediante el ionóforo es reversible simplemente mediante su eliminación del medio, y así los espermatozoides recuperan la motilidad, la hiperactivación y la capacidad de fecundar (Figura 12). En ese mismo trabajo se demostró además que cuando se utiliza un medio sin  $\text{Ca}^{2+}$  el ionóforo no detiene el movimiento de los espermatozoides, lo cual indica que el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular está involucrado en este fenómeno. Los espermatozoides bovinos inmovilizados por el ionóforo recuperan la motilidad después de la adición de una alta concentración de BSA al medio (Suarez, 1987), lo que sugiere que la BSA reduce la concentración efectiva de ionóforo, y como consecuencia, la concentración de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en los espermatozoides se reduce a niveles más fisiológicos (Tateno et al., 2013). Al igual que Tateno y col. 2013 en nuestro trabajo hemos observado que una concentración de 5 y 10  $\mu\text{M}$  de ionóforo inmoviliza inmediatamente a los espermatozoides de ratón.

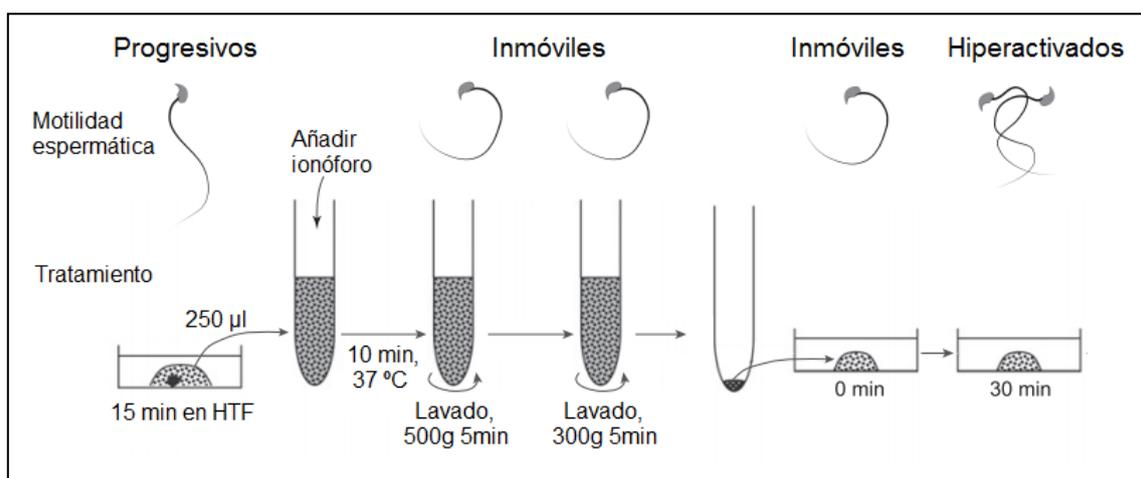


Figura 12. Comportamiento de los espermatozoides de ratón antes y después del tratamiento con el ionóforo. Modificado de (Tateno et al., 2013).

Por otra parte se ha demostrado que el tratamiento de espermatozoides con una concentración de 20  $\mu\text{M}$  del ionóforo seguido de su eliminación mediante centrifugaciones sucesivas ayuda a superar la infertilidad observada en

espermatozoides de ratón *Catsper1*<sup>-/-</sup>, *Slo3*<sup>-/-</sup> y *Adcy10*<sup>-/-</sup> (Navarrete et al., 2016). En nuestro caso observamos tanto en toro como en ratón que el tratamiento con concentraciones superiores 5  $\mu\text{M}$  inmovilizan a los espermatozoides y que su eliminación mediante centrifugaciones sucesivas permite la recuperación de la motilidad. Sánchez-Cárdenas y col. (2018) demostraron también en ratón que antes de inducir la inmovilización de los espermatozoides, concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  o superiores aumentan el latido flagelar y que concentraciones de 5-10  $\mu\text{M}$  del ionóforo elevan sustancialmente el  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e inmoviliza los espermatozoides en pocos minutos, concentraciones más bajas (0,5 y 1  $\mu\text{M}$ ) provocan aumentos de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  más pequeños y provocan la hiperactivación de espermatozoides. Esto confirma que los aumentos de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  actúan como un interruptor de motilidad. Al igual que Sánchez-Cárdenas y col. (2018) en este trabajo observamos que a los pocos minutos de añadir el ionóforo a una concentración de 5 y 10  $\mu\text{M}$  los espermatozoides de ratón se inmovilizan y que una concentración de 1  $\mu\text{M}$  no consigue detener a los espermatozoides. Sin embargo a diferencia de Sánchez-Cárdenas y col. (2018) con 1  $\mu\text{M}$  no observamos una motilidad hiperactiva.

La motilidad hiperactivada de los espermatozoides se caracteriza por una baja progresividad de las trayectorias lo que se traduce, en cuanto a los parámetros del análisis mediante CASA, en una baja linealidad (LIN), baja rectitud (STR) y baja frecuencia de batido (BCF) (Mortimer et al., 1998). Navarrete y col. (2016) demostraron que el ionóforo aumenta el porcentaje de hiperactivación y capacidad fecundante de los espermatozoides de ratones de la cepa C57BL/6J. Los espermatozoides de dicha cepa se caracterizan por presentar tasas significativamente bajas de hiperactivación durante la capacitación y son menos eficientes para la fecundación *in vitro*, esto cuando se compara con otras cepas como la CD1. En el trabajo de Navarrete y col. (2016) se muestra que espermatozoides de la cepa C57BL/6J tratados con o sin ionóforo a una concentración de 20  $\mu\text{M}$  presentaron porcentajes de hiperactivación de 8 y 18% respectivamente, el tratamiento con el ionóforo mejoro el porcentaje de hiperactivación en esta cepa llevándolo a valores muy similares a los de la cepa CD1 donde de manera normal se observa un 20% de hiperactivación. Ya sea con o sin ionóforo los porcentajes de hiperactivación observados en las cepas C57BL/6J y CD1 son muy bajos, esto puede

explicarse en parte a que se trata de líneas puras, donde la homocigosidad es elevada y de alguna forma afecta a la calidad de los gametos. Nosotros hemos usado la cepa híbrida B6D2F1, que presenta espermatozoides de mejor calidad. Como se muestra en la Tabla 2 en ratón tanto el tratamiento de 5  $\mu\text{M}$  como el de 10  $\mu\text{M}$  de ionóforo disminuyeron estos tres parámetros de motilidad con respecto al tratamiento control indicando la ocurrencia de hiperactivación y confirmando los resultados reportados por Navarrete y col. (2016). Además encontramos que la suspensión basal de espermatozoides (tiempo 0) presentó una motilidad del 51% que se vio disminuida en el control con un valor de 30% debido seguramente al desgaste que el espermatozoide sufre durante las centrifugaciones (Tabla 2), tal como fue observado por Makler y Jakobi (1981). El tratamiento de 1  $\mu\text{M}$  también mostró este descenso de motilidad a entorno al 30%. Sin embargo cuando se trataron los espermatozoides con 5 y 10  $\mu\text{M}$  de ionóforo la motilidad alcanzó valores de 55 y 62% respectivamente similares a los del control a tiempo 0 antes de la centrifugación, esto quiere decir que a pesar del desgaste de los espermatozoides durante las centrifugaciones, la mayoría de ellos se activaron nuevamente gracias al efecto del ionóforo sobre los mismos, tal como lo han observado también Tatenó y col. (2013).

En cuanto a espermatozoides bovinos congelados, Garasuso y col. (2014) observaron un incremento del porcentaje de espermatozoides hiperactivos dosis dependiente con respecto al tratamiento con ionóforo. La suspensión basal de espermatozoides presentó una motilidad del 65%, el control negativo y control DMSO presentaron una motilidad con valores de 36 y 28% respectivamente, este descenso de motilidad puede deberse en gran parte a la manipulación que los espermatozoides sufren durante las centrifugaciones que implica el tratamiento con el ionóforo. Estos autores no observaron diferencias entre los espermatozoides tratados con 0,1 y 0,2  $\mu\text{M}$ , teniendo estos valores de 66 y 68% respectivamente. Sin embargo la motilidad de los espermatozoides tratados con 0,3  $\mu\text{M}$  se vio ligeramente reducida respecto a la basal, obteniendo esta un valor de 58%. Este incremento de la hiperactividad observado después del tratamiento con el ionóforo, sugirió una probable mejora en la capacidad fecundante, que debía ser confirmada mediante FIV, lo cual se hizo en el presente trabajo y se discutirá más adelante. Dado el alto porcentaje de espermatozoides con el

acrosoma reaccionado (ver siguiente apartado) en las muestras de espermatozoides bovinos congelados, no nos fue posible realizar una evaluación objetiva de la motilidad, ya que en la gran parte de los espermatozoides nadan en pares o forman aglutinaciones lo cual dificulta su análisis.

## 6.2. Análisis de la reacción acrosómica en ratón y toro

En un primer estudio, Lakoski y col. (1988) evaluaron el efecto del tratamiento durante 30 minutos con ionóforo a una concentración de 3  $\mu\text{M}$  sobre la reacción acrosómica en espermatozoides de ratón tras previa incubación de 60 minutos en condiciones capacitantes. Este procedimiento provocó que el 83% de los espermatozoides tratados con el ionóforo sufrieran la reacción acrosómica en contraste con el control sin tratamiento en el cual fueron solo un 35%. Tateno y col. (2013) comprobaron el mismo efecto del tratamiento con ionóforo en espermatozoides de ratón pero utilizando citometría de flujo. En este estudio, los autores reportan que 20  $\mu\text{M}$  de ionóforo provocó que el acrosoma reaccionara en un 50% de los espermatozoides en contraste con el control donde fue solo en un 22%. Recientemente Rodolis y col. (2016) siguieron este mismo procedimiento y encontraron que un 21% de los espermatozoides de ratón vivos se encontraban reaccionados tras un tratamiento con el ionóforo al 5  $\mu\text{M}$ , mientras que en el control negativo solo un 9% habían reaccionado. En nuestro estudio en ratón, la suspensión basal de espermatozoides (tiempo cero) mostró reacción acrosómica en un 22% de los espermatozoides mientras que en el control negativo y control DMSO fue de alrededor del 43%. Posiblemente, esto se deba al efecto de la centrifugación como se ha reportado con anterioridad (Daramola, 2017). El porcentaje de acrosomas reaccionados fue de 74 y 79% cuando se utilizaron concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{M}$  de ionóforo respectivamente, no habiendo diferencias entre ellas, por lo que se podría decir que alcanzamos saturación del efecto del ionóforo sobre la reacción acrosómica a 5  $\mu\text{M}$  (Figura 5), Gramajo-Buhler y col. (2012) encontraron saturación del uso del ionóforo para inducir reacción acrosómica a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  en espermatozoides de chinchilla.

En contraste con el semen de ratón que fue utilizado tras su extracción directa del epidídimo, en bovino utilizamos semen congelado/descongelado. Es por ello que nuestro nivel inicial de reacción acrosómica en el semen de toro fue del 76%, ya que es sabido que el mismo proceso de congelación/descongelación induce la reacción acrosómica en toro (Reckova y col. 2015). Este elevado porcentaje de espermatozoides con acrosoma reaccionado hace que la mayoría naden en pares y formen aglutinaciones lo que imposibilita su análisis de motilidad mediante CASA. Cuando usamos ionóforo tanto a 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  no encontramos diferencias en la tasa de espermatozoides reaccionados (Figura 11), observando un 76% cuando usamos ionóforo a una concentración de 0,3  $\mu\text{M}$  y 84% cuando utilizamos 10  $\mu\text{M}$ . Posiblemente los espermatozoides han alcanzado una máxima tasa de reacción acrosómica durante el proceso de congelación/descongelación y no quedan espermatozoides susceptibles a ser activados por el ionóforo. Reckova y col. (2015) estudiaron el efecto de la heparina a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  sobre la reacción acrosómica en espermatozoides bovinos congelados, en la Figura 13 podemos ver que tampoco encontraron diferencias en cuanto al uso o no heparina, así mismo podemos observar que desde el tiempo cero la mayoría de los espermatozoides ya se encontraban reaccionados, y que en el tratamiento con heparina es en la hora 5 donde se alcanza un máximo porcentaje de espermatozoides reaccionados (63,8%), Klinc y col. (2007), evaluaron la reacción acrosómica en semen fresco bovino y encontraron que solo un 7% de los acrosomas habían reaccionado después de que el semen había sido refrigerado por 24 horas. En nuestro estudio usamos Fert con heparina a la misma concentración que usaron Reckova y col. (2015).

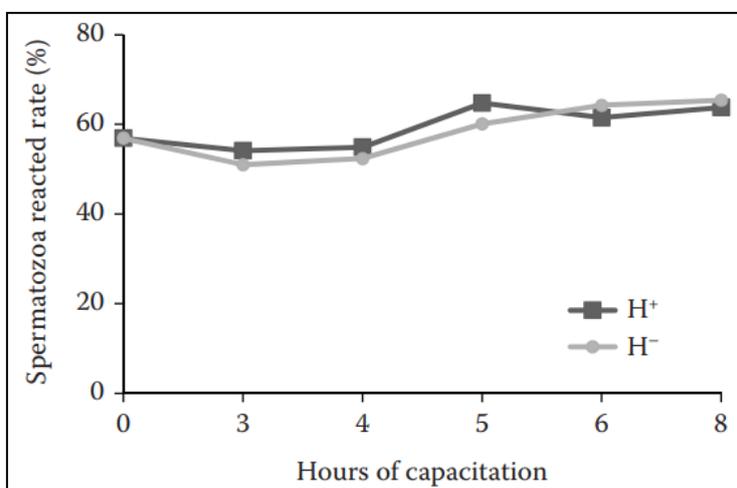


Figura 13. Cinética de cambios acrosómicos en espermatozoides bovinos que fueron capacitados con (H+) o sin (H-) heparina y evaluados a las 0, 3, 4, 5, 6 y 8 h. (Figura de Reckova et al., 2015).

### 6.3. Evaluación de la capacidad fecundante en ratón y toro

Umehara y col. (2018) examinaron el efecto de reducir la concentración espermática durante la FIV en ratón, encontrando tasas de división a dos células de 72, 69, 42 y 4% cuando se usaban concentraciones de  $2 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^3$  espermatozoides/ml, en microgotas de 50  $\mu$ l, habiendo en cada microgota  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$  y 50 espermatozoides respectivamente. Nuestro control negativo a una concentración de  $1 \times 10^5$  espermatozoides/ml mostró valores diferentes a lo largo del desarrollo de nuestro experimento (Tablas 4, 5 y 6), obteniendo tasas de fecundación de 49% al principio del experimento a 73% en las últimas replicas, valor que más se acerca al 69% obtenido por Umehara y col. (2018). Esta variación en nuestros resultados posiblemente se debió a la práctica adquirida en el manejo de los gametos y embriones durante el desarrollo del trabajo.

Cuando usamos ionóforo a una concentración de 1  $\mu$ M no encontramos efecto sobre las tasas de fecundación (Tabla 4). Sin embargo con 5  $\mu$ M demostramos un aumento de la fecundación con respecto al control, este aumento se hizo evidente cuando utilizamos una concentración subóptima de  $1 \times 10^5$  espermatozoides/ml aumentando la fecundación de 49 al 68%. Por el contrario cuando empleamos la concentración de 10  $\mu$ M observamos un efecto negativo del ionóforo ya que las tasas de fecundación bajaron (Tabla 6), indicando un posible efecto tóxico a esta concentración.

Tateno y col. (2013) estudiaron el efecto de los espermatozoides de ratones B6D2F1 tratados con ionóforo a una concentración de 20  $\mu$ M sobre la rapidez con la que penetraban a los oocitos, a diferencia de nosotros, ellos realizaron solo un lavado por centrifugación, una vez lavados los espermatozoides fueron incubados por media hora para posteriormente llevar a cabo la fecundación *in vitro*. Pasada media hora de coincubación de gametos, los espermatozoides tratados con el ionóforo habían penetrado el 100% de los oocitos mientras que los espermatozoides no tratados con ionóforo habían penetrado solo un 42% de los oocitos. Si bien nosotros no estudiamos la rapidez de penetración de los oocitos, puede que este factor explique nuestro incremento en las tasas de fecundación utilizando 5  $\mu$ M.

Navarrete y col. (2016) demostraron que el ionóforo mejora la capacidad fecundante de los espermatozoides de ratones de la cepa C57BL/6J, los espermatozoides de dicha cepa son menos eficientes para la fecundación *in vitro*, esto cuando se le compara con otras cepas como la CD1. De manera convencional la tasa de fecundación de los espermatozoides de la cepa C57BL/6J es de 42%, cuando los espermatozoides son tratados con el ionóforo la tasa de fecundación se eleva hasta un 83%, equiparando a la tasas de fecundación que se obtienen de manera convencional en la cepa CD1. En el mismo estudio, la producción de blastocistos en la cepa C57BL/6J fue de 49 y 83% sin o con ionóforo respectivamente. En nuestro estudio sin importar condición/tratamiento, no se observaron diferencias significativas en cuanto a porcentaje de blastocistos, porcentaje que se situó entre 81 y 87%.

Respecto a bovino, en 2003 Ward y col. (2003) examinaron el efecto de reducir la concentración espermática durante la FIV y no encontraron diferencias utilizando una concentración de  $5 \times 10^5$  y  $2,5 \times 10^5$  espermatozoides/ml teniendo una tasa de división a dos células del 70% y tasas de producción de blastocistos de cerca de 40%. Sin embargo, cuando se utilizó una concentración de  $63 \times 10^3$  espermatozoides/ml se observó que la tasa de división descendió a un 49% y la producción de blastocistos a un 26%. En nuestro estudio en bovino usamos tres controles de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml, sin ionoforo, llamados Control Lab, Control Fert y Control DMSO, tratamientos que presentaron tasas de clivaje de 78, 83 y 80% respectivamente, y tasas de producción de blastocistos de 35, 39 y 27 % respectivamente (Tabla 7), no habiendo diferencias con los experimentos de FIV a concentración de  $5 \times 10^5$  y  $2,5 \times 10^5$  espermatozoides/ml. Estos resultados fueron similares a los reportados por Ward y col. (2003), indicando una saturación de espermatozoides cuando se usa una concentración igual o mayor a  $2,5 \times 10^5$  espermatozoides/ml. Cuando utilizamos la concentración de  $63 \times 10^3$  espermatozoides/ml observamos un descenso de la división, 83 y 55% para el control  $1 \times 10^6$  y control  $63 \times 10^3$  respectivamente, y producción de blastocistos, 39 y 19% para el control  $1 \times 10^6$  y control  $63 \times 10^3$  respectivamente, valores similares a los reportados también por Ward y col. (2003).

Decidimos usar la concentración de 0,3 Mm para tratar los espermatozoides bovinos en base al estudio de Garasuso y col. (2014), donde se observó un incremento del

porcentaje de espermatozoides hiperactivos cuando se usaba dicha concentración de ionóforo. Además también usamos la concentración de 5  $\mu\text{M}$ , basándonos en la experiencia positiva que observamos usando dicha concentración de ionóforo en espermatozoides de ratón. Usando una concentración espermática de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml, las tasas de división descendieron a un 70% y 60% cuando se usó el ionóforo a una concentración de 0,3  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$  respectivamente. Usando una concentración espermática de  $63 \times 10^3$  espermatozoides/ml, el porcentaje de división se ubicó en torno al 50% no habiendo diferencias con los controles sin ionóforo.

Por lo tanto, no observamos un efecto del ionóforo sobre las tasas de producción de embriones bovinos. La falta de inducción de la reacción acrosómica, alta a nivel basal por el proceso de congelación/descongelación del semen, puede indicar que la población que es activada por el ionóforo no es susceptible a este. Estudios sobre el efecto del ionóforo con semen fresco serían necesarios para confirmar dicha hipótesis.

## 7. CONCLUSIONES

1. Los espermatozoides de ratón tratados con una concentración de 5 y 10  $\mu\text{M}$  de ionóforo de calcio A23187 inician un tipo de motilidad vigorosa, denominada hiperactivación.
2. En ratón, el ionóforo de calcio A23187 induce la reacción acrosómica de manera dosis dependiente.
3. En ratón, el uso de ionóforo de calcio A23187 a una concentración de 5  $\mu\text{M}$  aumenta la eficiencia de la fecundación *in vitro* en concentraciones subóptimas de espermatozoides.
4. En ratón, el uso de ionóforo de calcio A23187 a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  redujo la eficiencia de la fecundación *in vitro*.
5. El proceso de congelación y descongelación de espermatozoides bovinos induce la reacción acrosómica en la mayoría de estos, por lo que la heparina y el ionóforo de calcio A23187 no ejerce algún efecto sobre los mismos.
6. Utilizando semen congelado, el ionóforo de calcio A23187 a concentraciones 0,3 y 5  $\mu\text{M}$  no afectó a la eficiencia de la fecundación *in vitro* en bovino.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abaigar, T., Holt, W., Harrison, R., y Del Barrio, G. (1999). Sperm subpopulation in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol. Reprod*, 60, 32-41.
- Alnagar F., Brennan P., y Brewis I. (2010). Bicarbonate-dependent serine/threonine protein dephosphorylation in capacitating boar spermatozoa. *J Androl*, 31(4), 393-405.
- Amann, R., y Hammerstedt, R. (1980). Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biol. Reprod*, 23, 647-656.
- Austin, C. (1951). Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res*, 4, 581-596.
- Avella, M., y Dean, J. (2011). Fertilization with acrosome-reacted mouse sperm: implications for the site of exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(50), 19843-19844.
- Avenarius, M., Hildebrand, M., Zhang, Y., Meyer, N., Smith, LL., Kahrizi, K., Najmabadi, H., y Smith, R. (2009). Human male infertility caused by mutations in the CATSPER1 channel protein. *Am J Hum Genet*, 84, 505-510.
- Babcock, D., First, N., y Lardy, H. (1976). Action of ionophore A23187 at the cellular level. Separation of effects at the plasma and mitochondrial membranes. *J Biol Chem*, 251(13), 3881-3886.
- Brenker, C., Goodwin, N., Weyand, I., Kashikar, N., Naruse, M., Krähling, M., Müller, A., Kaupp, U., y Strünker, T. (2012). The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm. *EMBO J*, 31(7), 1654-1665.
- Brum, A., Thomas, A., Sabeur, K., y Ball, A. (2006). Evaluation of Coomassie blue staining of the acrosome of equine and canine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res*, 67, 358-362.
- Buffone, M., Ijiri, T., Cao, W., Merdiushev, T., Aghahanian, H., y Gerton, G. (2012). Heads or Tails? Structural Events and Molecular Mechanisms That Promote Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis and Motility.

- Carlson, A., Westenbroek, R., Quill, T., Ren, D., Clapham, D., Hille, B., Garbers, D., y Babcock, D. (2003). CatSper1 required for evoked Ca<sup>2+</sup> entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 14864-14868.
- Chang, M. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 168, 697-698.
- Cheuquemán, C., Merino, O., Giojalas, L., Von Baer, A., Sánchez, R., y Risopatrón, J. (2013). Assessment of sperm function and DNA fragmentation in ejaculated alpaca sperm (*Lama pacos*) by flow cytometry. *Reprod. Domest. Anim*, 48, 447–453.
- Cross, N. (1998). Role of Cholesterol in Sperm Capacitation. *Biol Reprod.*, 59, 7-11.
- Daramola, James. (2017). Effect of Centrifugation on Motility, Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Soy Bean and Avocado Seed Milk Extenders of Cryopreserved Goat Spermatozoa. *Agricultura Tropica et Subtropica*, 50.
- Darszon A., Acevedo J., Galindo B., Hernández-González E., Nishigaki, T., Treviño, C., Wood, C., y Beltrán, C. (2006). Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction*, 131(6), 977-88.
- DasGupta, S., Mills, C., y Fraser, L. (1993). Ca<sup>2+</sup>-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J Reprod Fertil*, 99, 135-143.
- Davis, R., y Siemers, R. (1995). Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. *Reproduction, Fertility and Development*, 7, 857-869.
- de Loos, F., van Vliet, C., van Maurik, P., y Kruip, T. (1989). Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Research*, 24, 197-204.
- Dragileva, E., Rubinstein, S., y Breitbart, H. (1999). Intracellular Ca(2+)-Mg(2+)- ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa. *Biol Reprod*, 61, 1226-1234.
- Du Plessis, S., Kashou, A., Benjamin, D., Yadav, S., y Agarwal, A. (2011). Proteomics: A subcellular look at spermatozoa. *Reproductive biology and endocrinology. Reproductive Biology and Endocrinology*, 9, 36.

- Eddy, E. y O'Brien, D. (1995). The Spermatozoon. In *The Physiology of Reproduction* (Knobil E. and Neill J.D., ed) Raven Press, New York.
- Eddy, E. (2007). The scaffold role of the fibrous sheath. *Soc.Reprod Fertil.Suppl*, 65, 45-62.
- Etkovitz, N., Rubinstein, S., Daniel, L. y Breitbart, H. (2007). Role of PI3- kinase and PI4-kinase in actin polymerization during bovine sperm capacitation. *Biol Reprod*, 77, 263-273.
- Ferraz, M., Morató, R., Yeste, M., Arcarons, N., Pena, A., Tamargo, C., Hidalgo, C., Muiño, R., y Mogas, T. (2014). Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to in vitro sperm-oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. *Theriogenology*, 81,1067-1072.
- Flesch, F., y Gadella, B. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta*, 1469, 197-235.
- Flesch, F., Brouwers, J., Nievelstein, P., Verkleij, A., van Golde, L., Colenbrander, B., y Gadella, B. (2001). Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci*, 114, 3543-3555.
- Florman, H., Corron, M., Kim, T., y Babcock, D. (1992). Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev Biol*, 152, 304-314.
- Florman, H., Jungnickel, M., y Sutton, K. (2008). Regulating the acrosome reaction. *Int J Dev Biol*, 52(5-6), 503-10.
- Florman, H., y Storey, B. (1982). Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. *Dev Biol*, 91(1):121-30.
- Franzén, J. (1977). Sperm structure with regard to fertilization biology and phylogenetics. *Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien*, 123–138.
- Fraser, L., Abeydeera, L., y Niwa, K. (1995). Ca<sup>2+</sup>-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol Reprod Dev*, 40, 233-241.
- Fumuso, F., Giménez, M., Neild, D., Giuliano, S., Chaves, G., y Carretero, M. (2014). Comparación de métodos de lavado y tiempos de conservación de los frotis para evaluar el acrosoma

en espermatozoides de llama mediante la tinción de Coomassie Blue. *Spermova*, 4, 50-53.

Gadella, B., Lopes-Cardozo, M., van Golde, L., Colenbrander, B., y Gadella, T. Jr. (1995). Glycolipid migration from the apical to the equatorial subdomains of the sperm head plasma membrane precedes the acrosome reaction. Evidence for a primary capacitation event in boar spermatozoa. *J Cell Sci*, 108(3), 935-946.

Ganguly, A., Bansal, P., Gupta, T., Gupta, S. (2010). 'ZP domain' of human zona pellucida glycoprotein-1 binds to human spermatozoa and induces acrosomal exocytosis. *Reprod Biol Endocrinol*, 8,110.

Garaguso, R., Franco, M., Ortega, N., Fanti, T., y Mutto, A. (2014). 246 use of ionophore a23187 on bovine frozen sperm increases hyperactivated motility. *Reproduction, fertility, and development*, 27, 212-213.

Glover, F. (1968). Physical method of measuring the mobility of bull sperm. *Nature*. 219, 1263.

Graham, J. (2001). Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim. Reprod. Sci*. 68, 239-247.

Gramajo-Bühler, C., Zelarayán, L., Lopez, L., y Sánchez-Toranzo, G. (2012). Acrosome Reaction in the Epididymal Sperm of Chinchilla lanigera. Effect of Progesterone, A23187 and Stimulation of a GABAA-Like Receptor. *Journal of Experimental Zoology Part A Ecological Genetics and Physiology*, 317,258-265.

Handrow, R., First, N., y Parrish, J. (1989). Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. *J Exp Zool*, 252, 174-182.

Harrison, R., y Gadella, B., (2005). Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology*, 63, 342-351.

Hasuwa, H., Muro, Y., Ikawa, M., Kato, N., Tsujimoto, Y., y Okabe, M. (2010) Transgenic mouse sperm that have green acrosome and red mitochondria allow visualization of sperm and their acrosome reaction in vivo. *Exp Anim*, 59(1), 105-107.

Herrick, S., Schweissinger, L., Kim, S., Bayan, K., Mann, S., y Cardullo, R. (2005). The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J Cell Physiol*, 202, 663-671.

- Ho, H., Granish, K., y Suárez, S. (2002). Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca<sup>2+</sup> and not cAMP. *Dev Biol*, 250(1), 208-217.
- Hong, S., Chiu, P., Lee, K., Tse, J., Ho, P., y Yeung W. (2009). Cumulus cells and their extracellular matrix affect the quality of the spermatozoa penetrating the cumulus mass. *Fertil Steril*, 92(3), 971-978.
- Ikawa, M., Inoue, N., Benham, A., y Okabe, M. (2010). Fertilization: a sperm's journey to an interaction with the oocyte. *J Clin Invest*, 4, 984–994.
- Iwamatsu, T., y Chang, M. (1971). Factors involved in the fertilization of mouse eggs in vitro. *J Reprod Fertil*, 26, 197-208.
- Jenkins, T., Aston, K., Trost, C., Farley, J., Hotaling, J., y Carrell, D. (2014). Intra-sample heterogeneity of sperm DNA methylation. *Molecular Human Reproduction*, 21, 313-319.
- Jha, K., Shumilin, I., Digilio, L., Chertihin, O., Zheng, H., Schmitz, G., Visconti, P., Flickinger, C., Minor, W., y Herr, J. (2008). Biochemical And Structural Characterization Of Apolipoprotein A-I Binding Protein, A Novel Phosphoprotein With A Potential Role In Sperm Capacitation. *Endocrinology*, 149(5), 2108-2120.
- Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S., Chiba, K., y Hirohashi, N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 22;108(12), 4892-4896.
- Katz, D., y Dott, H. (1975). Methods of measuring swimming speed of spermatozoa. *J. Reprod. Fertil*, 45, 263.
- Katz, D., y Overstreet, J. (1981). Sperm motility assessment by video-micrography. *Fertil Steril*, 35, 188.
- Kershaw-Young, C., y Maxwell, W. (2011). The effect of seminal plasma on alpaca sperm function. *Theriogenology*, 76, 1197-1206.
- Kershaw-Young, C., Stuart, C., Evans, G., y Maxwell, W. (2013). The effect of glycosaminoglycan enzymes and proteases on the viscosity of alpaca seminal plasma and sperm function. *Anim. Reprod. Sci*, 138, 261–267.

- Klinc, P., Frese, D., Osmer, H., y Rath, D. (2007). Insemination with sexsorted fresh bovine spermatozoa processed in the presence of antioxidant substances. *Reprod Domest Anim*, 42, 58–62.
- Krause W. (1995). Computer-assisted semen analysis systems: comparison with routine evaluation and prognostic value in male fertility and assisted reproduction. *Human reproduction (Oxford, England)*, 10 Suppl 1, 60-66.
- Lakoski, K., Carron, C., Cabot, C., y Saling P. (1988). Epididymal maturation and the acrosome reaction in mouse sperm: response to zona pellucida develops coincident with modification of M42 antigen. *Biol Reprod*, 38, 221–233.
- Lee, M., y Storey, B. (1986). Bicarbonate is essential for fertilization of mouse eggs: Mouse sperm require it to undergo the acrosome reaction. *Biol Reprod*, 34(2), 349–356.
- Leibfried, L, First, N. (1979). Characterization of Bovine Follicular Oocytes and Their Ability to Mature In Vitro. *Journal of Animal Science*, 48, 76-86.
- Lishko, P., Kirichok, Y., Ren, D., Navarro, B., Chung, J., y Clapham, D. (2011). The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annu Rev Physiol*, 74, 453-475.
- Lishko, P., Botchkina, I., y Kirichok Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm. *Nature*, 17;471(7338), 387-391.
- Loeb, J. (1915). On the nature of the conditions which determine or prevent the entrance of the spermatozoon into the egg. *Amer. Nat*, 49, 257-285.
- Luna, C., Yeste, M., Rivera Del Alamo, M., Domingo, J., Casao, A., Rodriguez-Gil, J., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J., y Muino-Blanco, T. (2015). Effect of seminal plasma proteins on the motile sperm subpopulations in ram ejaculates. *Reproduction, fertility, and development*, In press.
- Makler, A., y Jakobi, P. (1981). Effects of Shaking and Centrifugation on Human Sperm Motility. *Archives of andrology*, 7, 21-26.
- Martin-Coello, J., Gonzalez, R., Crespo, C., Gomendio, M., y Roldan, E. (2008). Superovulation and in vitro oocyte maturation in three species of mice (*Mus musculus*, *Mus spretus* and *Mus spicilegus*). *Theriogenology*, 70, 1004-1013.

- Martínez-López, P., Santi, C., Treviño, C., Ocampo-Gutiérrez, A., Acevedo, J., Alisio, A., Salkoff, L., y Darszon, A. (2009). Mouse sperm K<sup>+</sup> currents stimulated by pH and cAMP possibly coded by Slo3 channels. *Biochem Biophys Res Commun*, 381, 204–209.
- Martínez-Pastor, F., Tizado, E., Garde, J., Anel, L., y de Paz, P. (2011). Statistical Series: opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology*, 75, 783-795.
- Michaut, M., Tomes, C., De Blas, G., Yunes, R., y Mayorga, L. (2000). Calcium-triggered acrosomal exocytosis in human spermatozoa requires the coordinated activation of Rab3A and N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Proc.Natl.Acad.Sci*, 97, 9996-10001.
- Mortimer, S. (2000). CASA practical aspects. *J. Androl.* 21, 515-524.
- Mortimer, S., Swan, M., y Mortimer, D. (1998). Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Hum. Reprod*, 13, 2139–2146.
- Muro, Y., Hasuwa, H., Isotani, A., Miyata, H., Yamagata, K., Ikawa, M., Yanagimachi, R., y Okabe, M. (2016). Behavior of mouse spermatozoa in the female reproductive tract from soon after mating to the beginning of fertilization1. *Biol Reprod*, 94, 157–163.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Internet], Ionophores; 1976. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68007476>.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Internet], Calcimycin; 1991. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=calcimycin>.
- Navarrete, F., Alvau, A., & Lee, H., Levin, L., Buck, J., Martin-Deleon, P., Santi, C., Krapf, D., Mager, J., Fissore, R., Salicioni, A., Darszon, A., y Visconti, P. (2016). Transient exposure to calcium ionophore enables in vitro fertilization in sterile mouse models. *Scientific Reports*, 6.
- O'Connor, M., Amann, R., y Saacke, R. (1981). Comparisons of computer evaluations of spermatozoal motility with Standard laboratory tests and their use for predicting fertility. *J. Anim. Sci*, 53(5), 1368-1376.
- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., y Giraldo, C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev. Col. Cienc. Pec*, 19, 426- 436.

- Overstreet, J., y Cooper, G. (1975). Reduced sperm motility in the isthmus of the rabbit oviduct. *Nature*, 258, 718-719.
- Parrish, J., Susko-Parrish, J., y First, N. (1989). Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod*, 41, 683-699.
- Perez-Cerezales, S., Laguna, R., Chacón de Castro, A., Sánchez-Calabuig, M., Cano-Oliva, de Castro-Pita, J., Montoro-Buils, L., Pericuesta, E., Fernández-González, R., y Gutiérrez-Adán, A. (2018). Sperm selection by thermotaxis improves ICSI outcome in mice. *Scientific Reports*, 8.
- Quinn, P., Kerin, J., y Warnes, G. (1985). Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril*, 44, 493-498.
- Quintero-Moreno, A., Miró, J., Rigau, T., y Rodríguez-Gil, J. (2003). Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*, 59, 1973-1990.
- Quintero-Moreno, A., Rigau, T., y Rodríguez-Gil, J. (2004). Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology*, 61, 673-690.
- Ramon, M., Jiménez-Rabadán, P., Garcia-Alvarez, O., Maroto-Morales, A., Soler, A., Fernández-Santos, M., Pérez-Guzmán, M., y Garde, J. (2014). Understanding Sperm Heterogeneity: Biological and Practical Implications. *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 30-36.
- Rečková, Z., Machatkova, M., Machal, L., y Jeseta, M. (2015). Relationship between acrosome integrity changes and in vitro fertilising ability of bovine spermatozoa. *Veterinární Medicína*, 60, 469-475.
- Reed, P., y Lardy, H. (1972). A23187: A divalent cation ionophore. *J Biol Chem*, 247(21), 6970-6977.
- Reid, A., Redgrove, K., Aitken R., y Nixon, B. (2011). Cellular mechanisms regulating sperm-zona pellucida interaction. *Asian J Androl*, 13(1), 88-96.

- Ribas-Maynou, J., Garcia-Peiro, A., Abad, C., Amengual, M., Navarro, J., y Benet, J. (2012). Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Human Reproduction*, 27,652-658.
- Rodolis, M., Huang, H., y Sampson, N. (2016). Glycopolymer induction of mouse sperm acrosomal exocytosis shows highly cooperative selfantagonism. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 474, 435-440.
- Sánchez-Cárdenas, C., Montoya, F., Navarrete, F., Hernández-Cruz, A., Corkidi, G., Visconti, P., y Darszon, A. (2018). Intracellular Ca<sup>2+</sup> threshold reversibly switches flagellar beat off and on. *Biology of Reproduction*.
- Sanchez, R., Toepfer-Petersen, E., Aitken, R., y Schill, W. (1991). A new method for evaluation of the acrosome reaction in viable human spermatozoa. *Andrologia*, 23, 197-203.
- Silvestroni, L., Mantovani, A., y Palleschi, S. (2004). The partial head decondensation test is a new, quick method to assess acrosome status in human spermatozoa. *Fertil. Steril*, 81, 1007-1012.
- Storey, B. (1975). Energy metabolism of spermatozoa. IV. Effect of calcium on respiration of mature epididymal sperm of the rabbit. *Biol Reprod*, 13(1), 1-9.
- Suarez, S., Vincenti, L., y Ceglia, M. (1987). Hyperactivated motility induced in mouse sperm by calcium ionophore A23187 is reversible. *J Exp Zool*, 244(2), 331-336.
- Suarez, S. (2008). Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod*, 14(6), 647-657.
- Sullivan, R., Frenette, G., y Girouard, J. (2007). Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl*, 9(4), 483-491.
- Tateno, H., y Mikamo, K. (1987). A chromosomal method to distinguish between X- and Y-bearing spermatozoa of the bull in zona-free hamster ova. *J Reprod Fertil*, 81(1), 19-125.
- Tateno, H., Krapf, D., Hino, T., Sánchez-Cárdenas, C., Darszon, A., Yanagimachi, R., y Visconti, P. (2013). Ca<sup>2+</sup> ionophore A23187 can make mouse spermatozoa capable of fertilizing in vitro without activation of cAMP-dependent phosphorylation pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 12; 110(46), 18543-18548.

- Thérien, I., y Manjunath, P. (2003). Effect of progesterone on bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod*, 69, 1408–1415.
- Tomes, C. (2007). Molecular mechanisms of membrane fusion during acrosomal exocytosis. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 65, 275-291.
- Umehara, T., & Kawai, T., Masaaki, G., Richards, J., y Shimada, M. (2018). Creatine enhances the duration of sperm capacitation: a novel factor for improving in vitro fertilization with small numbers of sperm. *Human reproduction (Oxford, England)*, 33.
- Vadnais, M., Galantino-Homer, H., y Althouse, G. (2007). Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation. *Arch Androl*, 53, 109-123.
- Visconti, P., Galantino-Homer, H., Moore, G., Bailey, J., Ning, X., Fornes, M., y Kopf, G. (1998). The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl*, 19(2), 242-248.
- Visconti, P., y Kopf, G. (1998). Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod*, 59, 1-6.
- Visconti, P., Krapf, D., de la Vega-Beltrán, J., Acevedo, J., y Darszon, A. (2011). Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl*, 13(3), 395-405.
- Visconti, P., Moore, G., Bailey, J., Leclerc, P., Connors, S., Pan, D., Olds-Clarke, P., y Kopf, G. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*, 121, 1139-1150.
- Vredenburg-Wilberg, W., y Parrish, J. (1995). Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Mol Reprod Dev*, 40, 490-502.
- Ward, F., Rizos, D., Boland, M., y Lonergan, P. (2003). Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: Work in progress. *Theriogenology*, 59. 1575-84.
- Ward W. y Coffey D. (1991). DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod*, 44, 569-574.
- World Health Organization (WHO). (2010). Laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva: WHO, 271.

- Xiao, X., y Yang, W. (2007). Actin-based dynamics during spermatogenesis and its significance. *J Zhejiang Univ Sci B*, 8, 498-506.
- Yanagimachi, R. (1975). Acceleration of the acrosome reaction and activation of guinea pigs spermatozoa by detergents and other reagents. *Biol Reprod*, 13(5), 519–526.
- Yanagimachi, R., y Chang, M. (1963). Fertilization of Hamster eggs in vitro. *Nature*, 200, 281-282.
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian Fertilization. In *The Physiology of Reproduction.*, Knobil E and Neill JD, ed. (New York: Raven Press), pp. 189- 317.
- Yang, W., y Sperry A. (2003). C-Terminal Kinesin Motor KIFC1 Participates in Acrosome Biogenesis and Vesicle Transport. *Biol Reprod*, 69, 1719-1729.
- Zeng, X., Yang, C., Kim, S., Lingle, C., y Xia, X. (2011). Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization-activated K<sup>+</sup> current in mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci*, 108, 5879-5884.

## 9. ANEXOS

### 9.1. Ratón

#### 9.1.1. Composición del medio M2

Componente	Referencia	mM
Hepes	Sigma H-4043	20,85
Cloruro de Calcio ( $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	Sigma C-7902	1,71
Cloruro de Sodio (NaCl)	Sigma S-5886	94,68
Cloruro Potásico (KCl)	Sigma P-5405	4,78
Fosfato Potásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Sigma P-5655	1,19
Sulfato de Magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	Sigma M-1880	1,19
Bicarbonato de Sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )	Sigma S-8875	4,15
Piruvato Sódico	Sigma P-2256	0,33
Glucosa Anhidra	Sigma G-7021	5,55
Lactato de Sodio 60% syrup (mL)	Sigma L-7900	33,64
Rojo de Fenol	Sigma P-5530	0,03
Penicilina	Sigma P-4687	0,17
Estreptomicina	Sigma S-9137	0,07
Albúmina (BSA)	Sigma A-3311	

#### 9.1.2. Composición del medio HTF

Componente	Referencia	mM
Cloruro de Calcio ( $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	Sigma C-7902	2,04
Cloruro de Sodio (NaCl)	Sigma S-5886	101,6
Cloruro Potásico (KCl)	Sigma P-5405	4,69
Fosfato Potásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Sigma P-5655	0,37
Sulfato de Magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	Sigma M-1880	0,2
Bicarbonato de Sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )	Sigma S-8875	25
Piruvato Sódico	Sigma P-2256	0,33
Glucosa Anhidra	Sigma G-7021	2,78
Lactato de Sodio 60% syrup (mL)	Sigma L-7900	30,52
Rojo de Fenol	Sigma P-5530	0,01
Penicilina	Sigma P-4687	0,2
Estreptomicina	Sigma S-9137	0,07
Albúmina (BSA)	Sigma A-3311	4mg / ml

### 9.1.3. PBS

Componente	Referencia	g/500 ml
<b>NaCl</b>	Merck 6404	4
<b>KCl</b>	Merck 4936	0,100
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Merck 4873	0,100
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O</b>	Merck 6580	0,715

## 9.2. Toro

### 9.2.1. Medio de Fecundación (Fert)

Componente	Referencia	mM
<b>NaCl</b>	Merck 10604	100
<b>KCl</b>	Merck 104936	3,1
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> * H<sub>2</sub>O</b>	Merck 106346	0,3
<b>CaCl<sub>2</sub> * 2H<sub>2</sub>O</b>	Merck 102382	2,1
<b>MgCl<sub>2</sub> * 6H<sub>2</sub>O</b>	Merck 105833	0,4
<b>Rojo de Fenol</b>	Merck 107241	

Suplementos:

2,16 g/l de bicarbonato de sodio.

1 mM de piruvato.

1 mM de lactato sódico (Sigma L4263).

6 g/l de BSA sin ácidos grasos.

5 ml/l de gentamicina.

10 µg / ml de heparina (Calbiochem 37505).

9.2.2. Composición del medio de cultivo in vitro (Fluido Sintético Oviductal, SOF)

Composición del stock A:

Componente	Referencia	MW (g/mol)	g/100 ml
NaCl	Merck 106404	58,44	6,290
KCl	Merck 104936	74,55	0,534
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck 104873	136,1	0,162
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	Merck 105886	120,4	0,182
Sigma H <sub>2</sub> O	Sigma W-1503		99,40 ml
Na-Lactato	Sigma L-4263	112,1	0,6 ml

Composición del stock B:

Componente	Referencia	MW (g/mol)	g/100 ml
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma S-5761	84,01	2,1
Rojo de fenol	Merck 107241	354,38	0,010
Sigma H <sub>2</sub> O	Sigma W-1503		100 ml

Composición del stock C:

Componente	Referencia	g/10 ml
Na-Piruvato	Sigma P-3662	0,080
Sigma H <sub>2</sub> O	Sigma W-1503	10 ml

Composición del stock D:

Componente	Referencia	g/10 ml
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	Sigma P-3662	0,262
Sigma H <sub>2</sub> O	Sigma W-1503	10 ml

Preparación del medio de cultivo SOF:

Componente	Referencia	MW (g/mol)	50 ml
Sigma H <sub>2</sub> O	Sigma W-1503		37 ml
Citrato Trisodio	Sigma S-4641	294,1	0,005 g
Myo-inositol	I-7508	180,2	0,0025 g
Stock A			5 ml
Stock B			5 ml

<b>Stock C</b>			0,5 ml
<b>Stock D</b>			0,5 ml
<b>BME 50 X</b>	B-6766		1,5 ml
<b>MEM 100 X</b>	M-7145		0,5 ml
<b>Glutamina</b>	G-6392		50 µl
<b>Gentamicina</b>	G-1272		250 µl
<b>BSA</b>	A-9647		0,15 g
<b>FCS (SFB)</b>		0.05	

Previo a uso añadir 5% de suero fetal bovino (FCS). Para la preparación de 10 ml añadir 0,5 ml FCS a 9,5 ml de SOF.

### 9.2.3. Tampón fosfato salino (PBS)

Composición del stock A

Componente	Referencia	g/500 ml
<b>NaCl</b>	Merck 6404	4
<b>KCl</b>	Merck 4936	0,100
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Merck 4873	0,100
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> * 2H<sub>2</sub>O</b>	Merck 6580	0,715

Composición del stock B:

Componente	Referencia	g/500 ml
<b>CaCl<sub>2</sub> * 2H<sub>2</sub>O</b>	Merck 2382	0,070
<b>MgCl<sub>2</sub> * 6H<sub>2</sub>O</b>	Merck 5833	0,100

Disolver completamente en 50 o 100 ml de Sigma H<sub>2</sub>O.

Mezclar A y B y añadir 0,500 (g/500ml) de D-glucosa (G8270), 0,018 (g/500 ml) de piruvato (P3662) y 2,5 (g/500ml) de gentamicina (G1272) y 500 ml de Sigma H<sub>2</sub>O.

Comprobar la osmolaridad (280 mOsm) y adicionar 0,25 g de BSA (A9647).

Comprobar PH (7,2-7,4) y filtrar (0,22 µm).