



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

Estudio funcional de los espermatozoides que responden a los quimioatrayentes fluido folicular, fluido oviductal, medio condicionado y progesterona en la especie porcina

**Dña. Alessia Diana**  
**2020**



Este trabajo experimental ha sido financiado por la Fundación Séneca, Saavedra Fajardo (20020/SF/16), MINECO-FEDER (AGL 2015-66341-R) y Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2019-106380RB-I00/AEI/10.13039/501100011033).

Alessia Diana disfrutó de una ayuda para estancia en el extranjero de alumnos de doctorado en la línea de actuación del Campus Mare Nostrum para la obtención de la mención internacional en el título de doctorado 2018/2019.



---

*AGRADECIMIENTOS*

---



## AGRADECIMIENTOS

Durante los años que he estado trabajando en esta tesis me he imaginado muchas veces este momento y hoy se ha hecho real.

No hubiese sido posible la finalización de esta sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citaré y muchas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en momentos de angustia y desesperación.

En primer lugar, quiero dar mis más sinceros agradecimientos a mis Directores de tesis Luis y Carmen por darme la oportunidad de trabajar con vosotros, por haber dirigido esta tesis con la misma pasión con la que lo hacéis todo y por todo el empeño y la paciencia para que esta tesis llegara a su fin.

Luis, gracias por ser más que un tutor, por todos los consejos desinteresados, por enseñarme todo lo que sabes, por estar ahí cada vez que tenía una duda, por la paciencia infinita aunque tenías que repetirme mil veces la misma cosa, por entender mi manera de ser. Creo no ser la misma persona que conociste hace tres años, y esto se debe en gran parte a ti. Gracias por ayudarme a crecer.

Carmen, gracias por todo el apoyo y el esfuerzo que has puesto en esta tesis, por tus consejos profesionales y por enseñarme a ver las cosas desde tu punto de vista. Aunque no ha sido nada fácil por lo mucho que soy cabezona. Gracias por ser dura y directa conmigo cuando llegó el momento de serlo, y por ser comprensiva como una madre en mis momentos de desesperación. Mil gracias.

Al departamento de Fisiología (Veterinaria) en su conjunto. A Joaquín, Pilar, Rakel, Sebas y Salva por tratarme como una más de los suyos y por estar siempre cuando lo necesitaba. Sobre todo, gracias a Fran y Juan por hacer mi ‘descanso-comida’ mucho más divertida (sé que me vais a echar mucho de menos jajaja), por estar siempre cuando necesitaba resolver alguna duda del último minuto, y no poder decir que no, por estar ahí siempre, incluso cuando no teníais por qué estarlo y por creer en mí y ayudarme a ver las cosas de manera positiva. Muchas gracias.

A las compañeras de laboratorio, Eve, Sole, Analuce, Jordana y Cristina, por haber siempre tenido tiempo para contestar a mis: ‘una preguntita por favor’, y por escucharme y animarme cuando más lo necesitaba. Mil gracias.

A Lucia y Ram por hacer de mis días en laboratorio y con los cerditos más entretenidos y divertidos, por los buenos momentos, las risas y por enseñarme el ‘dialecto murciano fluido y rápido’. Un millón de gracias.

No me puedo olvidar de todos los que han pasado por el laboratorio y por mi vida, Marta, Ernesto, Marina, Lucia y Ondrej. Todos habéis contribuido de alguna forma a que sea la persona que soy hoy en día y os doy las gracias por ello. Gracias por compartir momentos tan agradables y llenos de risas.

Agradezco de todo corazón a Carolina, el Dr. Miguel Sosa y todo el equipo del laboratorio de Mendoza (UNCUYO-CONICET-IHEM-Argentina) por recibirme con los brazos abiertos, por regalarme los tres meses más bellos de mi vida. Llegué sola pero no me hicisteis sentir sola ni un día. Gracias por todo el cariño, por los momentos copartidos, por los ‘stick de mozzarella’, por las risas y por hacerme sentir una más en tierra mendocina.

Mil Gracias a ‘los últimos doctorandos’, Gabi y Sergio, mis compañeros de batallas en el laboratorio, por vuestra amistad, vuestra inestimable ayuda en la elaboración de los experimentos, sobre todo en los cálculos de matemática (todavía me quedan dudas jaja), por las peleas y los enfados y luego querernos aún más. Gracias por animarme siempre y estar a mi lado cada vez que lo necesitaba.

A mis grandes amigos, Chiara y Daniel... no puedo explicar en unas cuantas líneas todo lo que habéis aportado a mi vida. En primer lugar, gracias por ser las personas que desde el primer momento me brindaron y me brindan todo el apoyo, colaboración y cariño sin ningún interés, gracias por vuestra desinteresada amistad. Mil gracias por aguantarme. Por soportarme. Por tirarme un salvavidas cuando había que hacerlo. Por creer siempre en mí y darme la fuerza para seguir adelante. Por estar ahí cuando estaba feliz, pero aún más cuando me sentía triste y perdida. Por la cantidad de momentos buenos que

hemos pasado tanto dentro como fuera del laboratorio, por todos los café y las comidas ciccionas, por las buenas charlas, las risas, por entender mi carácter y mi manera de ser y nunca juzgarme y por darme la posibilidad de contar siempre con vuestro apoyo en cualquier momento. Non smetterò mai di ringraziarvi! Alla fine questa tesi è anche un pò vostra, quindi godetevela anche voi!

Gracias a mis amigas Gaia y Giuliana por empezar este viaje conmigo y nunca abandonarme. Por apoyarme en la que fue la decisión más importante de mi vida. Por todos los buenos momentos llenos de risas. Gracias por seguir en mi vida y por vuestra sincera amistad.

Un agradecimiento especial a Raúl, por ser la persona que ha compartido el mayor tiempo a mi lado, porque en tu compañía las cosas malas se convierten en buenas, la tristeza se transforma en alegría y la soledad no existe. Gracias por animarme cuando más lo necesitaba, por brindarme siempre una ‘palabra bonita’ cuando me sentía sola y perdida, por apoyarme en todo momento y por aguantarme y sopórtame. Gracias por quererme sin condiciones. Eres una persona muy especial. Esta tesis va para ti también.

Por último, agradezco de todo corazón a toda mi familia, sin vosotros no hubiera sido posible. A mi hermana Antonella y mi hermano Donato, que a pesar de la distancia siempre han estado presentes en todo momento y han apoyado todas mis decisiones.

Un agradecimiento muy especial a mis padres por haber estado ahí siempre para apoyarme, animarme, por creer en mí y por no haber puesto nunca pegas a mis decisiones. Por permitirme seguir adelante para crearme un futuro mejor. Y esto me lleva a agradecer a la Fundación Diana-Scognamiglio, por ser mi única financiación durante estos años y gracias a la cual he podido realizar esta tesis. Estaré eternamente agradecida. Esta tesis va para vosotros.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis doctoral, con sus altos y bajos, haciendome entender que el camino es duro y lleno de obstáculos, pero la recompensa es increíble.



*“TODAY IS ONLY ONE DAY IN ALL THE DAYS THAT WILL EVER BE.  
BUT WHAT WILL HAPPEN IN ALL THE OTHER DAYS  
THAT EVER COME CAN DEPEND ON WHAT YOU DO TODAY.”*

*ERNEST HEMINGWAY*



*Tutto quello che sono, tutto quello che sarò  
lo devo all'amore incondizionato di mia madre  
che mi ama anche quando do il peggio di me;  
a mio padre  
che mi ha insegnato a lottare per i miei sogni;  
e alla costante presenza di mia sorella  
che, nonostante la distanza non mi ha mai fatto sentire sola.*







## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	7
2. SUMMARY.....	15
3. INTRODUCCIÓN.....	23
3.1. El recorrido del espermatozoide desde su origen al sitio de fecundación.....	26
3.2. Proceso de capacitación espermática y factores que lo regulan.....	27
3.3. Reservorio espermático.....	33
3.4. Interacción de los espermatozoides con el ambiente oviductal tras la ovulación.....	36
3.5. Exosomas de los fluidos biológicos y su función sobre la funcionalidad espermática.....	38
3.6. Mecanismos implicados en el transporte de los espermatozoides hasta el lugar de fecundación.....	40
3.6.1. Reotaxis.....	41
3.6.2. Termotaxis.....	43
3.6.3. Quimiotaxis.....	44
3.6.3.1. Señalización molecular durante el proceso quimiotáctico.....	46
3.6.3.2. Fluidos biológicos como quimioatrayentes.....	48
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	51
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	55
5.1. Materiales.....	57
5.2. Métodos.....	64
5.2.1. Ética.....	64
5.2.2. Obtención de biofluidos.....	64
5.2.2.1. Obtención del fluido folicular.....	64
5.2.2.2. Obtención del fluido oviductal.....	65

5.2.2.3. Obtención del medio condicionado.....	65
5.2.3. Obtención del semen y análisis de la funcionalidad espermática.....	65
5.2.3.1. Procesado espermático.....	66
5.2.3.2. Dispositivo para el estudio de los quimioatrayentes.....	66
5.2.3.3. Concentración espermática.....	67
5.2.3.4. Evaluación de la motilidad de los espermatozoides.....	67
5.2.3.5. Localización de la fosforilación de tirosina mediante Inmunofluorescencia indirecta.....	68
5.2.3.6. Evaluación de la integridad del acrosoma espermático.....	69
5.2.3.7. Test hipoosmótico (hypoosmotic swelling-test) para espermatozoides porcino.....	70
5.2.3.8. Inhibición de la entrada de calcio al espermatozoide.....	70
5.2.3.9. Evaluación de la fragmentación del ADN espermático.....	71
5.2.3.10. Análisis de las proteínas y metabolitos en los biofluidos mediante HPLC-MS.....	73
5.2.4. Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos.....	77
5.2.5. Fecundación <i>in vitro</i> y cultivo embrionario.....	77
5.2.5.1. Fijación y evaluación de cigotos y embriones.....	79
5.3. Análisis estadístico.....	79
5.4. Diseño experimental.....	80
5.4.1. Experimento 1. Determinación de la actividad quimiotáctica del FF, FO, MC y P4.....	80
5.4.2. Experimento 2. Características morfológicas y funcionales de los espermatozoides que migraron hacia el quimioatrayente.....	83
5.4.3. Experimento 3. Efecto de la selección espermática por el fluido folicular sobre la calidad embrionaria.....	84
6. RESULTADOS.....	87

6.1. Experimento 1. Determinación de la actividad quimiotáctica del FF, FO, MC y P4.....	89
6.2. Experimento 2. Características morfológicas y funcionales de los espermatozoides que migraron hacia el quimioatrayente.....	102
6.3. Experimento 3. Efecto de la selección espermática por el fluido folicular sobre la calidad embrionaria.....	107
7. DISCUSIÓN.....	111
8. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	133
9. ABREVIATURAS.....	139
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	147







## 1. RESUMEN

En mamíferos, de los miles de millones de espermatozoides que son depositados en el genital de la hembra, solamente una cantidad muy reducida será capaz de alcanzar el oviducto y almacenarse en el reservorio espermático. Posteriormente, cuando la ovulación ocurre, parte de esta selecta población se liberará de su unión a las células epiteliales del istmo para alcanzar la ampolla y fecundar al ovocito (Hunter *et al.*, 1983; Hunter, 1984). Sin embargo, el encuentro espermatozoide-ovocito no es un evento que ocurra al azar, sino que los espermatozoides deben ser guiados hasta el gameto femenino (Eisenbach & Giojalas, 2006). El paso del istmo, donde se encuentra el reservorio, a ampolla, lugar de fecundación en porcino, responde a tres mecanismos de orientación: reotaxis (movimiento del espermatozoide en contra del flujo hacia el ovocito), termotaxis (movimiento del espermatozoide hacia el ovocito guiado por un gradiente de temperatura), y quimiotaxis (movimiento del espermatozoide hacia el ovocito guiado por un gradiente de concentración de atrayentes químicos). La quimiotaxis es una técnica que se viene utilizando cada vez más en estudios de espermatozoides *in vitro*. La mayoría de estos estudios se centran principalmente en analizar la dirección del movimiento y el comportamiento de los espermatozoides en presencia de algún quimioatrayente, principalmente, la progesterona (P4). El uso de biofluidos procedentes de la hembra como quimioatrayentes, es una buena alternativa para seleccionar y estudiar espermatozoides aptos para la fecundación. Además, en estos biofluidos no sólo se ha demostrado que contenga P4 en su composición, sino que también se ha observado la presencia de otros componentes capaces de actuar como quimioatrayente. Asimismo, el uso de biofluidos como quimioatrayentes ha mostrado resultados promisorios en diferentes especies, como la humana (Ralt *et al.*, 1994; Oren-Benaroya *et al.*, 2008), bovina (Gil *et al.*, 2008), lagomorfos (Fabro *et al.*, 2002) y roedores (Oliveira *et al.*, 1999). Si bien, pocos estudios se han centrado en el uso de biofluidos como quimioatrayentes para la selección de espermatozoides en la especie porcina y su impacto sobre la calidad embrionaria.

Las hipótesis que nos planteamos en este trabajo fueron que los biofluidos reproductivos [fluido folicular (FF), fluido oviductal (FO) y medio condicionado (MC)] en la especie porcina, tanto de manera individual como en su conjunto, tienen efectos quimiotácticos y son dependientes de la concentración. Además, la selección de espermatozoides por parte de los biofluidos modifica las características bioquímicas y funcionales de los espermatozoides, por lo que mejoran la calidad embrionaria tras la fecundación *in vitro* (FIV).

Con el propósito de desarrollar estas hipótesis planteamos los siguientes objetivos. i) Determinar la capacidad quimiotáctica y concentración óptima de los biofluidos (FF, FO y MC) sobre espermatozoides porcinos. ii) Realizar un estudio comparativo de las características funcionales y bioquímicas de los espermatozoides que responden o no a factores quimiotácticos. iii) Analizar componentes en los biofluidos responsables de la actividad quimiotáctica y iv) Determinar si existe relación entre la calidad embrionaria y los espermatozoides que respondieron al quimioatrayente FF.

La selección de espermatozoides potencialmente fértiles por los biofluidos se llevó a cabo mediante un dispositivo que disponía de dos pocillos a los que hemos denominado A y B comunicados entre sí mediante un tubo. En el pocillo A se depositaron  $20 \times 10^6$  espermatozoides/mL diluidos en TALP, mientras que en el pocillo B, se depositó el medio TALP suplementado o no con los quimioatrayentes de estudio.

En la primera experiencia se determinó la concentración óptima de los biofluidos reproductivos (FF, FO y MC) que mayor número de espermatozoides seleccionaban después 20 min de quimiotaxis. Para ello se estableció una curva de dilución en forma de campana, utilizando como valores de referencia aquellos en los que el rendimiento de la FIV, determinado en estudio previo en nuestro laboratorio, se vio mejorado [1% (v/v) de FF, 1% (v/v) de FO y 2% (v/v) de MC]. Las concentraciones empleadas (v/v) para establecer la curva de dilución con los diferentes biofluidos fueron: FF: 0,13%, 0,25%, 0,5%, 1% y 1,5%; FO: 0,13%, 0,25%, 0,5%, 1% y 1,5%; y MC: 0,033%, 0,065%, 0,13%, 0,25% y 0,5%. Las concentraciones de P4 empleadas como quimioatrayente control, fueron: 1, 2,5, 5, 7,5 y 10

pM. Además, una vez establecida las concentraciones de los biofluidos reproductivos que mayor proporción de migración espermática proporcionaban, se incluyó un grupo ( $\Sigma$ ) compuesto por la suma de los tres biofluidos (FF + FO + MC) para comprobar si había o no algún efecto sinérgico entre estos compuestos. Asimismo, ya que es conocido que el fenómeno de la quimiotaxis se encuentra estrechamente relacionado con la activación de los canales CatSper y el incremento de calcio intracelular  $[Ca^{2+}]_i$  que se produce cuando estos canales se activan, se estudió el efecto del inhibidor NNC 55-0396, el cual bloquea los canales CatSper y reprime la entrada de calcio ( $Ca^{2+}$ ) en el espermatozoide.

Además, se estudió la composición de los biofluidos reproductivos mediante la técnica de HPLC-MS/MS para determinar la presencia de algunas sustancias relacionadas con la quimiotaxis como: P4, estradiol (E2), adenosín monofosfato cíclico-3',5' (AMPC) y guanosín monofosfato cíclico (GMPc). También se analizó la presencia de proteínas presentes en dichos biofluidos relacionadas con la quimiotaxis y la relación que existe entre ellas.

Cuando analizamos las concentraciones utilizadas en la curva de dilución, las concentraciones 0,25% de FF, 0,25% de FO, 0,065%, 0,13% de MC y 10 pM de P4, fueron las que proporcionaron el mayor porcentaje de espermatozoides seleccionados. Por otro lado, observamos que valores superiores a los descritos no incrementaban la migración espermática. Cuando utilizamos las concentraciones a las que cada biofluido proporcionaba la mayor actividad quimiotáctica no se observaron diferencias en el porcentaje de espermatozoides seleccionados entre los quimioatrayentes utilizados. Para averiguar la posibilidad de que se pudieran potenciar los biofluidos si todos estuvieran presentes en un mismo pocillo, utilizamos la suma de los tres biofluidos  $\Sigma$  (FF + FO + MC). Los resultados no mostraron un incremento en el porcentaje de espermatozoides seleccionados respecto del resto de grupos experimentales.

Por otro lado, al analizar si el efecto quimiotáctico de estos biofluidos se veía mermado al inhibir los canales de  $Ca^{2+}$ , observamos que los espermatozoides incubados con el inhibidor NNC 55-0396,

disminuían su capacidad de migrar hacia el pocillo B, tanto en presencia de quimioatrayentes como para el caso del grupo control.

Por último, cuando analizamos los componentes presentes en los biofluidos (FF, FO y MC) relacionados con la quimiotaxis, observamos que el FF presentaba la mayor cantidad de E2, P4 y GMPc, el FO mayor cantidad de AMPc, mientras que los valores más bajos se observaron en el MC, a excepción de E2 y P4 que eran más elevada que en el FO. En relación a los componentes proteicos, se observó la presencia de guanilato ciclasa (GC), adenilato ciclasa (AC) y el péptido natriurético atrial (PNA) o isoformas de estas en todos los biofluidos. No obstante, la GC fue la única proteína en común entre los tres biofluidos.

Como conclusión a esta experiencia podemos decir que los biofluidos reproductivos (FF, FO y MC) en la especie porcina, tienen efectos quimiotácticos y son dependientes de la concentración.

Para determinar si los espermatozoides seleccionados por parte de los biofluidos tenían mejor características funcionales, nos planteamos como segunda experiencia realizar un estudio comparativo de la calidad seminal. Para ello, analizamos la integridad acrosomal, motilidad, test hipoosmótico, fosforilación en tirosina, FIV y fragmentación de ADN.

En relación a la integridad acrosomal, los resultados mostraron que los valores más altos de espermatozoides con el acrosoma integro, tras la migración hacia los quimioatrayentes, se presentaban en los grupos FF, FO y MC, aunque solo el grupo FO mostró un mayor porcentaje de espermatozoides con acrosoma integro respecto del grupo  $\Sigma$ .

La motilidad espermática tras la migración hacia el quimioatrayente, no mostró diferencias entre los grupos experimentales.

Los espermatozoides seleccionados por los quimioatrayentes presentaron mayor porcentaje de respuesta positiva a las condiciones hipoosmóticas respecto a espermatozoides no atraídos por un

quimioatrayente, mostrando un cambio morfológico evidenciado por una curvatura de diferente grado en el flagelo espermático.

La capacitación de los espermatozoides, proceso en que ocurren cambios funcionales y moleculares que implican cambios secuenciales y que confieren al espermatozoide la capacidad de fecundar, viene regulada por los fluidos reproductivos. Por ello, decidimos analizar la localización de la fosforilación de tirosina de los espermatozoides que habían migrado hacia los diferentes quimioatrayentes. Al evaluar los resultados de los patrones de fosforilación en los espermatozoides, observamos que los espermatozoides que migraron hacia los quimioatrayentes habían sido capacitados dado que se producía un incremento de fosforilación respecto a la muestra sin tratar, encontrándose los valores más altos para el patrón III (región acrosomal y ecuatorial fosforiladas). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ellos.

Para evaluar de forma conjunta todos los parámetros de calidad seminal, se planteó averiguar el efecto de la selección espermática por quimiotaxis sobre la FIV. Los resultados mostraron después de 18h de inseminación que el mayor número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida ocurrió en los grupos TALP y FF. Asimismo se observó que el FF presentaba el mayor porcentaje de ovocitos penetrados. Sin embargo, no existieron diferencias entre los grupos experimentales en cuanto al número de espermatozoides por ovocito penetrado.

Tras el análisis de los resultados de la segunda experiencia, observamos que solo aparecieron diferencias en los parámetros de FIV entre el FF y los otros quimioatrayentes. Por ello, se decidió evaluar el ADN de los espermatozoides que migraron hacia el FF y los espermatozoides que lo hicieron hacia el TALP. El análisis se realizó inmediatamente después de la quimiotaxis y tras 24h de incubación a 38,5°C y 5% CO<sub>2</sub>. Para determinar la fragmentación del ADN utilizamos dos técnicas: naranja de acridina y el kit Halomax®. Observamos que el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado, era casi casi nulo con las dos técnicas mencionadas.

Como conclusión a esta segunda experiencia, podemos decir que los espermatozoides seleccionados por los quimioatrayentes solo presentaron mejores características funcionales cuando se sometieron a una condición hipoosmótica. Además, únicamente los espermatozoides seleccionados con el FF incrementaron la tasa de penetración.

En la *tercera experiencia* nos planteamos analizar la posible relación entre la selección espermática con el FF y la calidad embrionaria, analizando la producción de embriones desde la división embrionaria a las 48h hasta el estadio de blastocisto expandido a las 168h.

Antes de analizar los blastocistos, ha sido necesario realizar un control de FIV que nos ha permitido averiguar la producción de los posibles cigotos que posteriormente llegarían a estadio de blastocisto. Los resultados a las 18h post-inseminación mostraron que el porcentaje de ovocitos penetrados fue superior para el grupo TALP. Sin embargo, el número medio de espermatozoides por ovocito y la formación de los pronúcleos fue mayor cuando los espermatozoides eran seleccionados con el FF. No obstante, en relación a los embriones obtenidos, observamos que el porcentaje de cigotos que se dividieron a las 48h era similar entre los dos grupos experimentales. Sin embargo, a las 168h cuando se evaluó el porcentaje de blastocistos obtenidos (expandidos y no expandidos) así como el número de células de estos, se observó un incremento significativo en el grupo FF respecto del control, lo que indica la mayor calidad embrionaria. Por tanto, la selección de espermatozoides mediante el quimioatrayente FF mejora la velocidad de desarrollo del embrión así como la calidad embrionaria.





## 2. SUMMARY

In mammals, only a very small amount of the billions of spermatozoa that are deposited in the female genitalia will be able to reach the oviduct and be stored in the sperm reservoir. Later on, when ovulation occurs, part of this select population will detach from the epithelial cells of the isthmus to reach the ampulla and fertilize the oocyte (Hunter *et al.*, 1983; Hunter, 1984). However, the sperm-oocyte encounter is not a random event, but rather spermatozoa must be guided towards the female gamete (Eisenbach & Giojalas, 2006). The passage from the isthmus (where the reservoir is located) to the ampulla (fertilization site in pigs) is regulated by three orientation mechanisms: rheotaxis (sperm journey against the flow, towards the oocyte), thermotaxis (guided by a temperature gradient), and chemotaxis (guided by a concentration gradient of chemical attractants). Specifically, the latter is a technique that is being used more and more in *in vitro* sperm studies. Most of the research focused typically on analyzing the movement direction and behavior of spermatozoa, in the presence of some chemoattractants, the main one being progesterone (P4). The use of biofluids as chemoattractants is a good alternative for the selection and study of spermatozoa suitable for fertilization. Furthermore, it has been shown that these biofluids not only contain P4, but also other components capable of acting as chemoattractants. Likewise, the use of biofluids has shown promising results during chemotaxis in different species, such as human (Ralt *et al.*, 1994; Oren-Benaroya *et al.*, 2008), bovine (Gil *et al.*, 2008), lagomorphs (Fabro *et al.*, 2002) and rodents (Oliveira *et al.*, 1999). However, few studies have focused on using biofluids for sperm selection in the porcine species and its impact on embryo quality.

Our hypotheses for this work were that reproductive biofluids [follicular fluid (FF), oviductal fluid (OF) and conditioned medium (CM)], both individually and as a whole, have chemotactic effects and are concentration dependent in the porcine species. Furthermore, the sperm selection mediated by biofluids modifies the biochemical and functional characteristics of spermatozoa, thereby improving embryo quality after *in vitro* fertilization (IVF).

To develop these hypotheses, we established the following objectives. i) Determine the chemotactic activity and optimal concentration of biofluids (FF, OF y CM) on porcine sperm. ii) Carry out a comparative study of the functional and biochemical characteristics of spermatozoa that respond or not to chemotactic factors. iii) Analyze the components responsible for the chemotactic activity in these biofluids and iv) Determine if there is a relationship between embryo quality and spermatozoa that responded to the follicular fluid chemoattractant.

The selection of potentially fertile spermatozoa mediated by biofluids was carried out using a device that had two wells, named A and B, which communicated with each other through a tube. In well A,  $20 \times 10^6$  spermatozoa/mL diluted in TALP were deposited, while in well B, TALP supplemented or not with the corresponding chemoattractants.

In the first experiment, the optimal concentration of reproductive biofluids (FF, OF y CM) that selected the highest number of sperm was determined after 20 min of chemotaxis. For this, a bell-shaped dilution curve was established, using as reference values those in which the IVF performance, determined in a previous study in our laboratory, was improved [1% (v/v) of FF, 1% (v/v) of OF and 2% (v/v) of CM]. The concentrations (v/v) used to establish the dilution curve with the different biofluids were as follows: FF: 0.13%, 0.25%, 0.5%, 1% and 1.5%; OF: 0.13%, 0.25%, 0.5%, 1% and 1.5%; and CM: 0.033%, 0.065%, 0.13%, 0.25% and 0.5%. The P4 concentrations used as a control chemoattractant were: 1, 2.5, 5, 7.5 and 10 pM. In addition, once the concentrations of the reproductive biofluids that provided the highest proportion of sperm migration had been established, a group ( $\Sigma$ ) composed of the sum of the three biofluids (FF + OF + CM) was included to verify, whether or not, there was any synergistic effect among these compounds. Furthermore, since it is known that the chemotaxis phenomenon is closely related to the activation of CatSper channels and subsequent increase in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , the effect of the inhibitor NNC 55-0396 was also studied, which blocks CatSper channels and inhibits the entry of  $\text{Ca}^{2+}$  inside spermatozoa.

Additionally, the composition of reproductive biofluids was studied using the HPLC-MS/MS technique, to determine the presence of some substances related to chemotaxis such as: P4, estradiol (E2), 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP). The presence of proteins related to chemotaxis and the relationship between them was also analyzed in these biofluids.

When analyzing the concentrations used in the dilution curve, we observed that 0.25% of FF, 0.25% of OF, 0.065%, 0.13% of CM and 10 pM of P4, provided the highest percentage of selected sperm. On the other hand, we observed that values higher than those described did not increase sperm migration. When we used the concentrations at which each biofluid provided the highest chemotactic activity, no differences were observed in the percentage of selected sperm between the chemoattractants used. In the attempt to find out if the effect of the biofluids could be enhanced when all were present in the same well, we used the sum of the three biofluids  $\Sigma$  (FF + OF + CM). The results did not show an increase in the percentage of selected sperm compared to the rest of the experimental groups.

On the other hand, when analyzing whether the chemotactic effect of these biofluids was diminished by inhibiting  $\text{Ca}^{2+}$  channels, we observed that the sperm incubated with the inhibitor NNC 55-0396 decreased their ability to migrate towards well B, both in the presence of chemoattractants and in the case of the control group.

Finally, when analyzing the chemotaxis-related components present in the biofluids (FF, OF and CM), we observed that FF presented the highest amount of E2, P4 and cGMP, OF contained the highest concentration of cAMP, whereas the lowest values were observed in CM, with the exception of E2 and P4, which were higher than in OF. Regarding the protein components, the presence of guanylate cyclase (GC), adenylate cyclase (AC) and atrial natriuretic peptide (PNA), or their isoforms, was observed in all biofluids. However, GC was the only common protein among them.

As a conclusion to this experiment, we can confirm that reproductive biofluids (FF, OF and CM) have chemotactic effects and are concentration dependent in the porcine species.

To determine whether the sperm selected by the biofluids had better functional characteristics, we considered carrying out a comparative study of semen quality, as a **second experiment**. For this purpose, we performed the following assays: acrosomal integrity, motility, hypoosmotic test, tyrosine phosphorylation, IVF and DNA fragmentation.

In relation to acrosomal integrity, the results showed that the highest values of spermatozoa with an intact acrosome after migration towards the chemoattractants, were present in the FF, OF and CM groups, even though only the OF group showed a higher percentage of acrosome-intact spermatozoa when compared to the  $\Sigma$  group.

When evaluating the sperm motility, no differences were observed between the experimental groups after chemotaxis.

The spermatozoa selected by the chemoattractants had a higher percentage of positive response to hypoosmotic conditions, than spermatozoa not attracted by a chemoattractant, showing a morphological change evidenced by a curvature of different degrees in the flagellum.

Sperm capacitation, a process in which functional and molecular modifications occur that involve sequential changes and that confer the fertilizing ability to spermatozoa, is regulated by reproductive fluids. For this reason, we decided to analyze the location of tyrosine phosphorylation in those spermatozoa that migrated towards the different chemoattractants. When evaluating the phosphorylation patterns, we observed that spermatozoa which migrated towards the chemoattractants had been capacitated, since there was an increase in phosphorylation compared to the untreated sample, with the highest values registered in the pattern III of phosphorylation (phosphorylated acrosomal and equatorial regions). However, no differences were found between the chemoattractants.

To jointly evaluate all the semen quality parameters, we decided to evaluate the effect of sperm selection by chemotaxis on IVF. After 18h of insemination, the results evidenced that the highest number of sperm attached to the zona pellucida was present in the TALP and FF groups. We also observed that the FF group was the one that showed the highest percentage of penetrated oocytes. However, we did not observe differences between the experimental groups regarding the number of sperm per penetrated oocyte.

After analyzing the results from the second experiment, we only observed differences in the IVF parameters between FF and the other chemoattractants. For this reason, we decided to assess the DNA of those spermatozoa which migrated towards FF and TALP, respectively. The analysis was performed immediately after chemotaxis and after 24h of incubation at 38.5 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Specifically, DNA fragmentation was analyzed using two techniques: acridine orange and the Halomax® kit. In both cases, we observed that the percentage of sperm with fragmented DNA was almost null.

As a conclusion to this second experiment, we can say that the spermatozoa selected by chemoattractants had better functional characteristics only when they were subjected to a hypoosmotic condition. Furthermore, only spermatozoa selected by FF increased the penetration rate.

In the third experiment, we decided to analyze the possible relationship between sperm selection with FF and embryo quality, by evaluating embryo production starting from the embryo division at 48h to the expanded blastocyst stage at 168h.

Before evaluating the blastocysts, it was necessary to perform a IVF control that allowed us to find out the production of possible zygotes which would later reach the blastocyst stage. The results at 18h after fertilization, showed that the percentage of penetrated oocytes was higher in the TALP group. However, the mean number of sperm per oocyte and the formation of pronuclei was higher when sperm were selected with FF. However, in relation to the embryos obtained, we observed that the percentage of zygotes that divided at 48h was similar between the two experimental groups.

Nevertheless, at 168h, when evaluating the percentage of obtained blastocysts (expanded and unexpanded), as well as their number of cells, a significant increase was observed in the FF group compared to the control, which indicates a higher embryo quality. Therefore, sperm selection with the FF chemoattractant improves both the speed of embryo development and embryo quality.





### 3. INTRODUCCIÓN.

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) en la especie humana han experimentado grandes avances en los últimos años. No obstante, estas técnicas aún podrían ser mejoradas, pues ninguna de ellas alcanza el rendimiento de la reproducción *in vivo*. En este sentido, cobran especial importancia los estudios basados en la fisiología reproductiva para la optimización de las actuales técnicas o el desarrollo de otras nuevas. El estudio y la aplicación de las TRA, requiere disponer de materiales biológicos ilimitados y modelos animales que permitan llevar a cabo una investigación minuciosa. Estos hechos dotan a la especie porcina como modelo de especial relevancia dada las grandes similitudes anatómicas, fisiológicas y genéticas que existen entre ambas especies (porcina y humana). Por ejemplo, se han obtenido resultados destacados relacionados con las vías de señalización *in vivo* (Luño Lázaro *et al.*, 2013) o *in vitro* (Soriano-Úbeda *et al.*, 2017) que conducen a la capacitación de los espermatozoides. Estos estudios han sido realizados utilizando medios definidos y biofluidos de manera que simulan condiciones *in vivo* de forma que permitan determinar posibles mejoras en la interacción y fecundación de gametos, así como en el desarrollo embrionario. Con estos avances se han solucionado muchas dudas, pero en contrapartida, se han abiertos nuevos caminos que plantean otras inquietudes relacionadas con la selección espermática con medios fisiológicos. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de profundizar el estudio de la fisiología y la funcionalidad de los espermatozoides, desde su deposición en el trato genital femenino hasta el reservorio espermático, los mecanismos que guían a los espermatozoides desde el reservorio hasta el ovocito (reotaxis, termotaxis, quimiotaxis), así como los componentes químicos y biológicos del tracto genital femenino que facilitan la interacción entre espermatozoides y ovocitos.

### 3.1. El recorrido del espermatozoide desde su origen al sitio de fecundación.

El espermatozoide es una célula haploide y móvil, cuya función es la formación de un cigoto totipotente tras la fusión de su núcleo con el del gameto femenino, el ovocito (Trebichalská & Holubcová, 2020). Sin embargo, antes de encontrarse con el ovocito, los espermatozoides sufren varias modificaciones antes de atravesar las diferentes barreras que rodean el ovocito.

Desde su origen, los espermatozoides se ven sometidos a un proceso de selección constante. En efecto, los fagocitos libres en el interior de los sacos testiculares eliminan las células defectuosas (Bonet & Molinas, 1986), luego, los espermatozoides siguen su recorrido pasando por la cabeza y cuerpo de epidídimo donde ocurre su maduración y, finalmente, a la cola del epidídimo donde serán almacenados. En este último lugar, vuelven a ser sometidos a otro proceso de selección por las células ameboides con capacidad fagocitaria, eliminando espermatozoides con alteraciones generadas por un extenso periodo de almacenamiento (Bonet & Molinas, 1986). En el tracto genital femenino de nuevo se produce otro proceso selectivo. En la vagina, cuello uterino o útero dependiendo de la especie, se depositan millones de espermatozoides (vivos, muertos, morfológicos y genéticamente normales y alterados) que deben atravesar un ambiente hostil donde serán sometidos a un estricto proceso de selección. En dicho proceso, en los primeros 30 min tras la monta o tras la inseminación artificial, se producirá un reflujo del eyaculado que oscila entre el 15-40% (Matthijs *et al.*, 2003). Posteriormente, alrededor de un 80% de espermatozoides serán eliminados por los polimorfonucleares. Finalmente, consecuencia de esa eliminación selectiva, solo una reducida población entorno al ~1% de espermatozoides viables, morfológica y genéticamente normales, alcanzará el reservorio espermático en el oviducto (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2005).

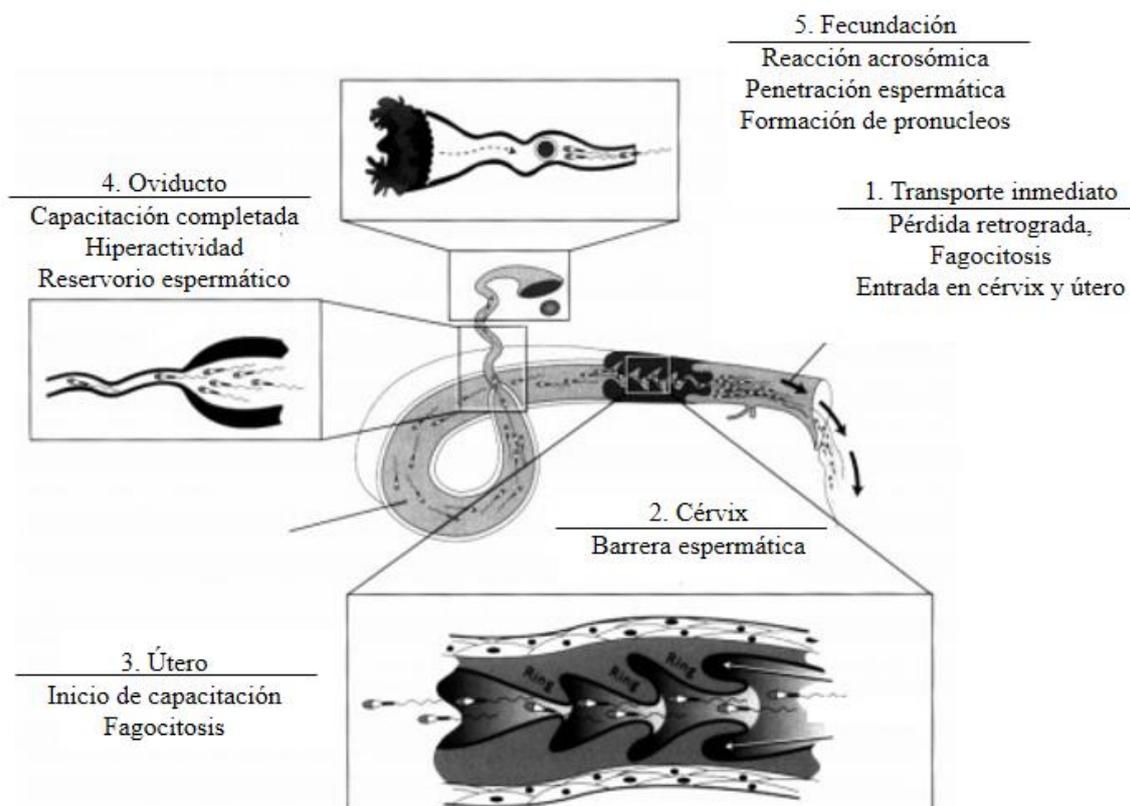


Figura 1. Recorrido del espermatozoide en el tracto genital femenino y eventos que ocurren en las distintas secciones del trato reproductivo de la hembra [tomada y modificada de (Senger, 1999)].

### 3.2. Proceso de capacitación espermática y factores que lo regulan.

Durante el recorrido a través del tracto genital femenino (Fig. 1), los espermatozoides experimentan un proceso complejo conocido como capacitación (Austin, 1952). Durante este proceso, ocurren modificaciones funcionales y moleculares controlados por diferentes vías (De Lamirande *et al.*, 1997) que implican cambios secuenciales y que conferiran al espermatozoide la capacidad de fecundar. La capacitación es un proceso complejo en el que se producen cambios rápidos en el momento que el espermatozoide es eyaculado. Sin embargo, otros cambios requieren un período de tiempo más largo en el tracto genital femenino (*in vivo*) o en un medio adecuado (*in vitro*), en el que los espermatozoides adquieren la capacidad para fecundar. En base a ello, Visconti (2009), sugirió que el fenómeno de la capacitación se podría dividir en dos etapas, por un lado, la capacitación rápida, cuando los espermatozoides entran en contacto con la secreción de las glándulas accesorias para ser

eyaculado y, por otro lado, la capacitación lenta la cual ocurre en el tracto genital femenino. Además, todo parece indicar que tanto en los cambios rápidos como los lentos se encuentran regulados principalmente por la vía adenilato ciclasa soluble (ACs)/AMPC/proteína quinasa A (PKA) y esta a su vez por aceptores de colesterol como la albumina, el bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) y el  $\text{Ca}^{2+}$ .

- Aceptores de colesterol.

La capacitación lenta a diferencia de la rápida, va más allá de activar la motilidad al entrar en contacto con el  $\text{HCO}_3^-$ , requiere de más tiempo en el tracto genital femenino para que los espermatozoides se expongan a otras moléculas específicas, como proteínas de alto peso molecular (albumina) y proteínas ligadas a colesterol (lipoproteínas de alta densidad), las cuales son capaces de eliminar el colesterol de la membrana y por ello, incrementar su fluidez así como su permeabilidad (Visconti *et al.*, 1998).

En presencia de albúmina, el  $\text{HCO}_3^-$  conduce a la activación del ACs de la membrana espermática que cataliza el metabolismo de AMPC. La albúmina actúa en sinergia con el  $\text{HCO}_3^-$  mediando la salida de los esteroides de la superficie de la membrana (Brouwers *et al.*, 2011; Boerke *et al.*, 2013). Flesch y Gadella (2000) observaron que la adición de albúmina causa eflujo de colesterol, pero solo en las células que estaban en presencia de  $\text{HCO}_3^-$ .

Igualmente, la capacitación lenta se puede lograr en condiciones *in vitro*, mediante la incubación de los espermatozoides en un medio con composición similar al oviducto, es decir que presente entre otros constituyentes una fuente de energía como piruvato, lactato o glucosa (dependiendo de la especie), albumina sérica como fuente proteica y  $\text{HCO}_3^-$  (> 15 mM) y  $\text{Ca}^{2+}$  (> 1 mM). En resumen, en presencia de  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y albumina se logra eliminar hasta un 40% de colesterol de la membrana plasmática de los espermatozoides y como resultado, incrementa fosforilación de proteínas a través de las vías de señalización de AMPC/PKA (Visconti *et al.*, 1995; Visconti & Kopf, 1998; Gadella, 2017).

- Bicarbonato.

Los espermatozoides adquieren la capacidad de mover el flagelo en su tránsito por el epidídimo, pero realmente el movimiento empieza después de la eyaculación, al entrar en contacto con el plasma seminal. Para ello, es crucial el contacto con el  $\text{HCO}_3^-$  y este hecho ocurre tanto *in vivo* como *in vitro* (Okamura *et al.*, 1965; Boerke *et al.*, 2013).

Una vez que los espermatozoides entran en el tracto genital femenino, concretamente al llegar al oviducto, se ven expuestos a concentraciones altas de  $\text{HCO}_3^-$  (35 mM en la fase folicular y 90 mM en la fase luteal) (Leese, 1988). En este momento se producirán importantes modificaciones en la membrana espermática del flagelo conducente a variar el patrón de movimiento (Wennemuth *et al.*, 2003). La entrada de  $\text{HCO}_3^-$  a través de la membrana se ha asociado con un aumento del pH intracelular durante la capacitación (Zeng *et al.*, 1996) y participa en la producción de AMPc al activar a la ACs (Visconti, 2009) la cual activa la PKA dando como resultado final la fosforilación de proteínas (Visconti *et al.*, 1998; Gadella & Harrison, 2002), estimula la glucólisis y el patrón de motilidad cambia a un movimiento hiperactivo (Gadella, 2017).

- Calcio.

El  $\text{Ca}^{2+}$  es otro reconocido componente que interviene en la capacitación. Entre otros efectos, se ha determinado que durante este proceso se produce un incremento en el interior del espermatozoide, tanto por influjo desde el exterior como por la salida de los reservorios de los espermatozoides (Breitbart, 2002).

Para que entre  $\text{Ca}^{2+}$ , es necesario que haya cambios en la fluidez de la membrana y se produzca la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . No está claro cómo el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular pasa la membrana plasmática durante la capacitación espermática, pero ha sido demostrada la presencia de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente del voltaje,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  entre otros (Flesch & Gadella, 2000). El aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en los espermatozoides puede activar una o más vías

enzimáticas. Por un lado, produce una activación de la enzima ACs lo que conduce a la conversión de adenosín trifosfato (ATP) en AMPc (Vadnais *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha sugerido la actuación conjunta entre el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{HCO}_3^-$  modulando la capacitación, donde la presencia de ambos fueron cruciales para el incremento del nivel de AMPc y la posterior fosforilación de la tirosina (Visconti & Kopf, 1998).

Entre los canales que permiten la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  y la hiperactivación espermática, se encuentran los canales CatSper. Los canales CatSper 1 y 2 están localizados a lo largo del cuello y la cola espermática (Carlson *et al.*, 2003) aunque recientemente, en la especie porcina se ha demostrado que en el acrosoma y en la región postacrosomal también se encuentran presentes (Vicente-Carrillo *et al.*, 2017). La importancia de estos canales se puso de manifiesto en los experimentos realizados con ratones *knockout* para genes de CatSper donde observaron que los animales que tenían este gen silenciado tenían ausencia de hiperactivación, motilidad y consecuentemente eran infértiles (Qi *et al.*, 2007).

- pH intracelular.

Otro aspecto que influye en la capacitación relacionada con el  $\text{Ca}^{2+}$  es el pH intracelular. Se ha observado que los espermatozoides que no están capacitados tienen un pH intracelular ligeramente acidificado (Parrish *et al.*, 1989), esto evita la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Florman *et al.*, 1992) y por tanto, la capacitación y la reacción acrosómica no se produce. A medida que el pH intracelular se vuelve más alcalino el nivel de capacitación va avanzando (Vredenburg-Wilberg & Parrish, 1995). Esta alcalinización se ve favorecida por la entrada de  $\text{HCO}_3^-$  y, entre otras consecuencias, favorecerá la despolarización de la membrana, regulará el metabolismo de AMPc y, finalmente desencadenará la fosforilación de proteínas (Ingermann *et al.*, 2002).

- Fosforilación de proteínas.

La fosforilación de las proteínas en residuos de serina, treonina y tirosina desempeña un papel importante en la capacitación de los espermatozoides. La fosforilación/desfosforilación de proteínas se controla mediante la actividad de las proteínas quinasas y las proteínas fosfatasa, que proporcionan a las células un "*switch*" a través del cual puede activar o no la función de varias proteínas (Signorelli *et al.*, 2013). A pesar de que se haya demostrado la fosforilación de serina y treonina en espermatozoide (Naz, 1999), la fosforilación de tirosina es la más estudiada por su relación con el proceso de la hiperactivación y capacitación de los espermatozoides en muchas especies [humanos (Baldi *et al.*, 2002), bovinos (Galantino-Homer *et al.*, 1997), murinos (Visconti & Kopf, 1998) o porcinos (Tardif *et al.*, 2001)]. No obstante, vale la pena mencionar que para que se lleve a cabo la fosforilación de la tirosina, la acción de las fosfatasa deben estar inhibida (Signorelli *et al.*, 2013).

El incremento en la fosforilación de tirosina durante la capacitación está regulado por la vía dependiente de AMPc/PKA (Kaláb *et al.*, 1998). Estudios en los que utilizaron un inhibidor específico para PKA en procesos relacionados con este enzima, dieron como resultado una reducción drástica en la fosforilación de residuos de tirosina (Visconti *et al.*, 1995; Visconti *et al.*, 1995). También se ha sugerido que el GMPc modula la capacitación de espermatozoides. Por un lado, regulando los canales de nucleótido cíclico (CNG) que permiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma de espermatozoide durante la capacitación y por otro lado, GMPc interviene en la fosforilación de tirosina por vía proteína quinasa (PKG) que también, indirectamente facilita la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la capacitación (Cisneros-Mejorado *et al.*, 2014).

Parece existir una estrecha relación entre la fosforilación de tirosina con la capacitación espermática en diferentes especies, sin embargo, a la hora de evaluar la fosforilación en residuos de tirosina, son varios los factores que se deben de tener en cuenta. Así, por ejemplo, dependiendo de la especie animal de la que provengan los espermatozoides, el requerimiento de los medios para que se lleve a

cabo la fosforilación puede variar. En este sentido, se ha observado que en humano no es tan importante la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  como la presencia de albúmina y  $\text{HCO}_3^-$  (Muratori *et al.*, 2011), en cambio, en la especie equina un incremento en la fosforilación de tirosina se produce cuando los espermatozoides se incuban en un ambiente con pH igual o superior a 7,8 y en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . En cambio, a pH  $\sim 7,4$  y en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  no se producía la fosforilación de tirosina, lo que demuestra que el  $\text{HCO}_3^-$  es más importante en esta especie en relación al  $\text{Ca}^{2+}$  (González-Fernández *et al.*, 2012).

- Óxido nítrico.

El óxido nítrico (ON) es una especie reactiva de oxígeno que se obtiene por la conversión de L-arginina a L-citrulina mediante la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (ONs) (Quintero Quinchia & Cardona Maya, 2017). Participa en multitud de funciones biológicas incluidas aquellas relacionadas con el proceso reproductivo. Tanto en el genital femenino como en el masculino, su síntesis tiene especial relevancia a pesar de su efecto dual. Altas concentraciones conducen al estrés oxidativo y muerte celular, sin embargo, bajas concentraciones son necesarias para el normal funcionamiento celular (Staicu & Matás, 2017).

Se sabe que el ON es el principal activador de la guanilato ciclasa soluble (GCs) para la producción de GMPc. Una vez formado el GMPc, regulará tres vías de señalización intracelular en el espermatozoide. I) activando sustratos PKG dependientes de GMPc, II) activando canales dependientes de nucleótidos cíclicos (CNG) y, III) mediante la inhibición de la fosfodiesterasa tipo 3 (PDE). La vía de señalización GMPc-PKG determina la fosforilación de serinas y treoninas, mientras, que la vía de señalización GMPc-CNG incrementa el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Existen 11 familias de las PDEs (PDE1-11), las PDE 4, 7 y 8 son específicas para AMPc, mientras que las 5, 6 y 9 las son para GMPc. Por otro lado, las PDEs 1, 2, 3, 10 y 11 son afines a ambos (AMPc y GMPc) (Bender & Beavo, 2006). Ambos nucleótidos cíclicos (GMPc y AMPc) compiten por el mismo sitio donde serán hidrolizados por las PDEs, y estas, a su vez, pueden ser activadas o inhibidas por ambos nucleótidos cíclicos (Bender & Beavo, 2006; Conti & Beavo, 2007). El hecho de competir por el

mismo sitio puede condicionar la acción de cualquiera de los nucleótidos cíclicos (Trötschel *et al.*, 2020). En efecto, la vía de señalización de GMPc-PDE funciona de la siguiente manera: el incremento en los niveles intracelulares de GMPc compite por el sitio de hidrolisis con el AMPc inhibiendo la posibilidad de su degradación por las PDEs de las que ambas tienen afinidad (1, 2, 3, 10 y 11). De esta forma se incrementan los niveles del AMPc intracelular, y por tanto se activa la PKA lo que conllevará a la fosforilación de proteínas. Por lo tanto, las tres vías distintas de cascadas de señalización que utiliza el GMPc conllevan a un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, fosforilación de diferentes proteínas que facilitan la hiperactivación espermática y la reacción acrosómica (Kurtz *et al.*, 1998) (Fig. 2).

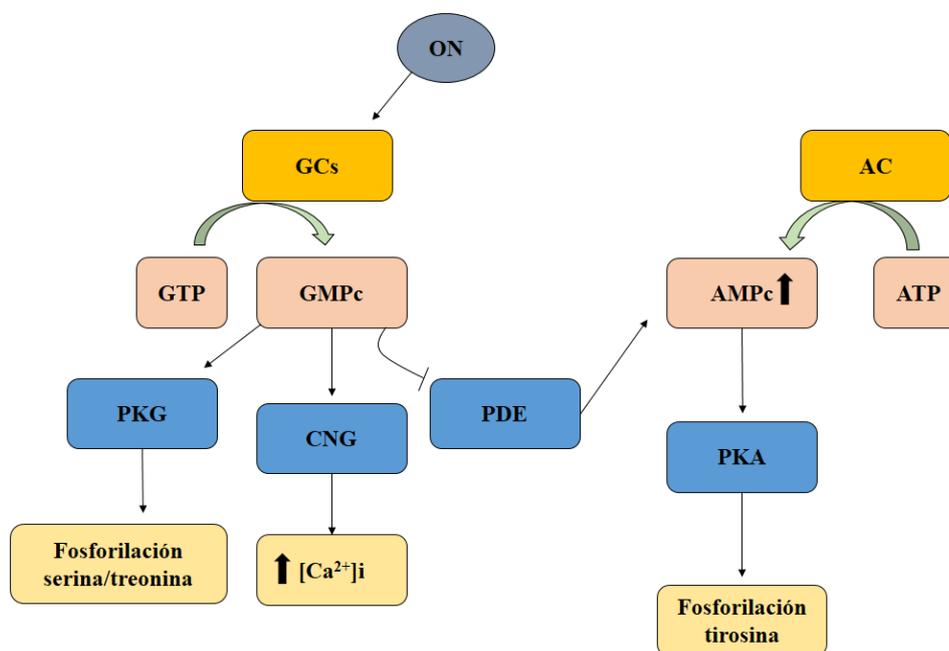


Figura 2. Mecanismo molecular del óxido nítrico. El ON activa GC para la producción de GMPc. Esto, de vuelta activa: PKG provocando la fosforilación de serinas y treoninas, CNG que incrementará el nivel de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e inhibe PDE que provoca un aumento de niveles de AMPc y se activará la PKA lo que conllevará a la fosforilación de proteínas.

### 3.3. Reservorio espermático.

De los millones de espermatozoides depositados en el tracto genital femenino, tras 1-2h, sólo una reducida población será capaz de seguir su trayectoria hacia la porción caudal del istmo oviductal, donde formarán el reservorio espermático (RE) (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2005).

Durante el periodo pre y peri-ovulatorio, una subpoblación de espermatozoides se dispone de forma aleatoria a lo largo de este reservorio unido a las células epiteliales ciliadas. El resto de espermatozoides no unidos, quedaran en la luz de este órgano atrapados en la espesa secreción del oviducto o formando aglomerados (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2001). En los estudios morfológicos realizados por Mburu *et al.* (1997) de las subpoblaciones espermáticas localizadas en la zona del RE (adheridas y no adheridas), observaron que los espermatozoides que se encontraban libres en la luz del túbulo y los que forman aglomerados tenían la membrana plasmática alterada, sin embargo esto no ocurría en los espermatozoides adheridos a las células epiteliales. Además, se ha demostrado que los espermatozoides adheridos a las células epiteliales tenían acrosoma intacto, morfología y cromatina normal es decir, las células del oviducto seleccionan aquellos espermatozoides con mejores cualidades para fecundar (López-Úbeda *et al.*, 2017).

Por lo tanto, dos subpoblaciones de espermatozoides funcionalmente distintas con la capacidad de alcanzar y entrar en el oviducto pueden ser discriminadas: (i) aquellos unidos al epitelio, que se consideran seleccionados por su alta calidad (Talevi & Gualtieri, 2010) localizados en el fondo de las criptas de los pliegues oviductales (donde forman un reservorio) y (ii) los que se encuentran en la luz no unidos al epitelio, y que muestran modificaciones de membrana o poca vitalidad (Mburu *et al.*, 1996).

La unión de los espermatozoides al epitelio oviductal está mediada por carbohidratos en las membranas apicales de las células oviductales y moléculas similares a la lectina en la superficie rostral de los espermatozoides. En momentos próximos a la ovulación, el ambiente oviductal cambiará de manera que provocará la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal (Töpfer-Petersen *et al.*, 2002) en un proceso secuencial después de la ovulación (Brüssow *et al.*, 2008) y nadarán hacia la región de la ampolla, donde ocurrirá la fecundación (Hunter, 2012). En estos momentos, se producirá el cambio en el batido flagelar caracterizado por un aumento en la amplitud de su curvatura (Suarez & Pacey, 2006). Este hecho parece ser debido a la activación de los canales

de  $\text{Ca}^{2+}$  CatSper presentes en el flagelo que determinará este tipo de movimiento (Miki & Clapham, 2013).

En todo caso, el RE tiene un microambiente idóneo para que los espermatozoides puedan permanecer durante un cierto periodo de tiempo hasta que ocurra la ovulación sin que su viabilidad se vea afectada (Tienthai *et al.*, 2004). Esta condición la propicia un conjunto de factores como: i) la concentración de glicosaminoglicanos (GAG) en esta región que a su vez conlleva a un incremento de la viscosidad, ii) una menor temperatura ( $\sim 1^\circ\text{C}$ ) debido a una reducción de los suministros vasculares y linfáticos y iii) la composición electrolítica o la actividad de la anhidrasa carbónica, particularmente intensa en esta región del oviducto (Fléchon & Hunter, 1981; Rodríguez-Martínez *et al.*, 1991) y más aún en la fase de estro (Lefebvre *et al.*, 1995).

Los GAG y en concreto, el ácido hialurónico (AH), son los componentes principales de la matriz extracelular del cumulus porcino. Estos aumentan alrededor de la ovulación y son claves para la permanencia y liberación de los espermatozoides en el RE. Son sintetizados gracias a la enzima hialuronano sintasa 3 (EHS-3) cuyo receptor CD44, se encuentran en las células epiteliales del RE y en el complejo cumulus-ovocito (COC) (Tienthai, 2015). El RE utiliza el AH (y los GAG en conjunto) para construir una estructura similar a una malla (Laurent & Fraser, 1992) o incluso formar gel (Toole, 2002) para evitar que los fluidos uterinos y ampulares pasen a través del RE durante el intervalo preovulatorio, manteniendo así aislados los espermatozoides en el RE (Hunter, 2002)

Los mecanismos que inducen la liberación de los espermatozoides del RE todavía son poco conocidos, pero se ha demostrado que el patrón de liberación de espermatozoide y su progresión a lo largo del istmo durante el período periovulatorio es secuencial, y probablemente continuo (Mburu *et al.*, 1996). Los espermatozoides se liberan gradualmente de la unión epitelial y, sometidos a hiperactivación progresiva, avanzan a lo largo del istmo hasta el sitio de fecundación. Esta liberación de espermatozoide podría ser debida a la modificación de los residuos de glicano en el epitelio por las glucosidasas oviductales. Tales cambios en el epitelio son la consecuencia del cambio del estradiol

folicular a la secreción de progesterona alrededor de la ovulación (Hunter, 2012). También se ha sugerido que el AH participa en la capacitación además de la liberación de espermatozoides desde el RE (Brüssow *et al.*, 2008).

### 3.4. Interacción de los espermatozoides con el ambiente oviductal tras la ovulación.

El ambiente oviductal sufre un importante cambio una vez que se produce la ovulación, de forma que los espermatozoides, se ven expuestos a unas condiciones específicas proporcionadas por el FO (Hunter *et al.*, 1999), parte del FF (Hansen *et al.*, 1991) y las secreciones de las células del cumulus (Galeati *et al.*, 2010). Este ambiente proporcionará al espermatozoide la capacidad de atravesar el *cumulus oophorus*, unirse a la zona pelúcida (ZP), sufrir la reacción acrosómica, atravesar la ZP y alcanzar el espacio perivitelino (Yanagimachi, 1984).

- Fluido oviductal.

La composición del FO durante la fecundación presenta una mezcla compleja de moléculas (aminoácidos, proteínas, lipoproteínas de alta densidad, hormonas de bajo peso molecular, lípidos, glicoproteínas de alto peso molecular, pequeños metabolitos) que están bajo influencia hormonal (Leese, 1988), y que, tanto de forma individual como en su conjunto desempeñan funciones claves en la capacitación (Visconti *et al.*, 1999) y guía de los espermatozoides (Eisenbach, 1999) para la fecundación y desarrollo embrionario temprano (Gonçalves *et al.*, 2007).

Centrándonos en las funciones de dichas moléculas sobre los espermatozoides en la ampolla, cabe destacar que los aminoácidos alanina, glicina, glutamina y lisina predominan en esta fase del ciclo y juegan un papel importante en la señalización y fuente de energía (Leese, 1988). Por otro lado, la alta concentración de  $\text{HCO}_3^-$  en la ampolla, además de intervenir en la respiración de los espermatozoides y capacitación, también promueve la dispersión de las células de cumulus que rodea al ovocito (Leese, 1988; Zhou *et al.*, 2005).

El FO es rico en proteínas de alto peso moleculares (albumina) y lipoproteínas de alta densidad, compuestos que promueven la salida del colesterol y que favorecen la capacitación y la fosforilación de la tirosina (Leese, 1988; Visconti *et al.*, 1999). La salida de colesterol también contribuye a la translocación de proteínas a la zona ecuatorial donde los espermatozoides se adhieren al ovocito (Leese, 1988).

- Fluido folicular.

A pesar de que la cantidad de FF que alcanza el lugar de fecundación se considera muy baja, es indudable su importancia dada su compleja composición donde aparecen, entre otros, hormonas como la P4, E2 y las prostaglandinas (PGE2, PGF2). La P4 y el E2, actúan como factores de activación y atracción de espermatozoides induciendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Leese, 1988; Hunter, 2012). También se ha constatado la presencia de otras sustancias igualmente importantes, como AMPc, GMPc, AC, GC y PNA. La función de estos compuestos parece ser la de guiar a los espermatozoides hacia la ampolla para que se lleve a cabo la fecundación (Leese, 1988; Anderson *et al.*, 1995; Revelli *et al.*, 2002; Bian *et al.*, 2012).

- Secreción de las células del *cumulus*.

Para el movimiento hiperactivo del espermatozoide se requiere una reducción del hidrogeno intracelular  $[\text{H}^+]_i$  y un aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , fenómeno controlado mediante la apertura de los canales  $\text{H}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  localizados en la membrana plasmática de los espermatozoides (Lishko & Kirichok, 2010). Estos canales están en parte regulados por la P4 liberada por las células del cumulus que rodean el ovocito. Además, se ha demostrado también que la P4 promueve la motilidad de los espermatozoides y esta, junto con el AH producido por el cumulus, promueven la reacción acrosómica (RA) de los espermatozoides que se encuentran cerca del ovocito (Suzuki *et al.*, 2002).

### 3.5. Exosomas de los fluidos biológicos y su función sobre la funcionalidad espermática.

Durante el recorrido del espermatozoide desde que abandona el testículo hasta el lugar de fecundación, sufrirá una importante remodelación que lo hará fértil. Parte de esta remodelación se produce a través de unas vesículas extracelulares producidas por las células epiteliales del epidídimo, glándulas accesorias, útero y oviducto.

Se han descrito varias vesículas extracelulares, entre ellas los exosomas. Estas tienen la capacidad de transferir al espermatozoide la carga que contengan, la cual dependerá de la célula que los produzca. En general contienen concentraciones altas de colesterol y esfingomielina (Ronquist & Brody, 1985; Kravets *et al.*, 2000; Arienti *et al.*, 2004; Burden *et al.*, 2006) además de numerosas proteínas que pertenecen a diferentes categorías, como enzimas, transporte, estructurales o proteínas de transducción de señales (Utleg *et al.*, 2003). Su inusual composición de membrana les confiere la capacidad de fusionarse e interactuar con otras células, especialmente importante en el caso de los espermatozoides. En general, la función principal de los exosomas es interactuar con los espermatozoides y protegerlos después de la eyaculación para mantener la capacidad de fecundación completa y prepararlo para su encuentro con el ovocito (Pons-Rejraji *et al.*, 2011).

En el fluido uterino, son liberados miARN, que modulan varios procesos reproductivos como el desarrollo folicular en el ovario, la maduración de los ovocitos, el desarrollo embrionario, la comunicación materno-embrionaria y el establecimiento de la gestación. Todo ello podría sugerir un mecanismo específico utilizado por el microambiente uterino para facilitar el proceso de fecundación (Burns *et al.*, 2014). Además, se ha observado la presencia de pequeñas vesículas extracelulares en el fluido uterino que desempeñan funciones importantes durante la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (Burns *et al.*, 2016). Asimismo, las células embrionarias pueden captar pequeñas vesículas extracelulares derivados del oviducto y endometrio. Por el contrario, las vesículas extracelulares derivados de embriones pueden modular la función oviductal y uterina (Bridi *et al.*, 2020).

La P4 secretada por el cuerpo lúteo, es necesaria para el establecimiento y mantenimiento de la gestación y actúa en el alargamiento y la supervivencia del *conceptus* (Spencer & Bazer, 2002). No obstante, también se ha observado que la P4 puede inducir cambios en la secreción de vesículas extracelulares en las células endometriales (Greening *et al.*, 2016). Así, por ejemplo, en la especie ovina ha sido determinado que en los días 10 a 14 del ciclo estral, se produce un aumento en la secreción de vesículas extracelulares por las células luminales endometriales, lo que sugiere que la P4 es responsable de este evento. Las vesículas extracelulares de la luz uterina tienen miARNs los cuales se ven aumentados por efecto de la P4, ello parece modular la fosfoinositida 3-quinasa/serina/treonina quinasa 1, factores de crecimiento como la proteína morfogenética) y también modula el silenciamiento postranscripcional por pequeñas vías de ácido ribonucleico (ARN) (Burns *et al.*, 2018).

Al parecer, existe una comunicación mediada por vesículas extracelulares entre el útero y la circulación periférica. Esta comunicación puede ser directa y modulada por factores biológicos secretados por el embrión, o bien indirecta, cuando el embrión estimula una respuesta del endometrio. Por lo tanto, las vesículas extracelulares pueden ser parte de este intrincado mecanismo que mejora las interacciones embrionarias y maternas y, en consecuencia, el éxito de la gestación en los mamíferos (Bridi *et al.*, 2020).

Sin embargo, las vesículas extracelulares juegan un papel importante también en relación a los espermatozoides. Estas se transfieren a los espermatozoides dentro de la cavidad uterina y del oviducto para garantizar la movilidad hiperactiva de los espermatozoides así como el potencial de fecundación (Nguyen *et al.*, 2016). Las vesículas extracelulares derivadas de diferentes partes del tracto femenino pueden ser absorbidas por los espermatozoides y afectar su competencia (Bridi *et al.*, 2020). En ese sentido, Franchi *et al.* (2016) demostraron que incubando espermatozoides con las vesículas extracelulares derivadas de células endometriales podría aumentar la fosforilación en tirosina y el porcentaje de espermatozoides que experimentan la RA. En base a este hallazgo, el

intercambio de las vesículas extracelulares puede ser sugerido como una forma emergente a través de la cual las células del tracto reproductivo femenino pueden interactuar con los espermatozoides (Murdica *et al.*, 2020).

Los exosomas presentes en el FO tienen un papel crucial en la maduración de los ovocitos, la capacitación espermática en su capacidad de fecundar, en la regulación del proceso de fecundación, en el desarrollo temprano del embrión así como en los primeros eventos reproductivos que conducen a la gestación (Almiñana & Bauersachs, 2020).

En condiciones capacitantes, los prostasomas (vesículas extracelulares secretadas por las células epiteliales de la glándula prostática) mejoran significativamente la integridad de la membrana plasmática, disminuyen los niveles de fosforilación de tirosina y la población capaz de experimentar la RA. Se ha demostrado que los exosomas actúan como complejos moduladores de las vías de transducción. Por ejemplo, inhiben los marcadores terminales de capacitación dependientes de PKA, pero no tienen efecto sobre el aumento de pHi. Por otro lado, se ha observado que el AMPc contenido en los exosomas puede ser transferido a los espermatozoides, aumentando significativamente el [AMPc]i en estas células (Pons-Rejraji *et al.*, 2011).

### 3.6. Mecanismos implicados en el transporte de los espermatozoides hasta el lugar de fecundación.

Desde hace bastante tiempo se ha planteado la pregunta de cómo los espermatozoides de mamíferos viajan dentro del tracto reproductivo femenino y finalmente alcanzan el ovocito. Contrario a lo que se pensó, parece que no hay competencia en el tracto genital femenino entre el gran número de espermatozoides que se mueven hacia el óvulo.

Los mecanismos de navegación de los espermatozoides en el genital de la hembra no se conocen bien. Sin embargo, está ampliamente aceptado que los espermatozoides siguen ciertas indicaciones durante el viaje (Pérez-Cerezales *et al.*, 2015). Los mecanismos de guía conocidos son la reotaxis [los

espermatozoides se reorientan en el flujo de fluido para alinearse contra la dirección del flujo y nadan contracorriente (Miki & Clapham, 2013)] la termotaxis [los espermatozoides nadan hacia el ovocito guiados por un gradiente de temperatura en el oviducto (Bahat *et al.*, 2012)] y la quimiotaxis [los espermatozoides son atraídos por quimioatrayentes secretados por los ovocitos y sus células del cumulus circundantes y nadan contra el gradiente químico (Cohen-Dayag *et al.*, 1994)].

Si bien se cree que la quimiotaxis y la termotaxis son procesos de detección activos (Teves *et al.*, 2009; Bahat & Eisenbach, 2010), aún se desconoce si la reotaxis implica la detección de flujo activo o no. Aunque se han propuesto modelos de mecánica de fluidos para explicar el giro de la reotaxis como un proceso pasivo (Kantsler *et al.*, 2014), otros estudios sugieren que la reotaxis de los espermatozoides es un proceso activo en el que el flujo de fluido es detectado por canales mecanosensitivos (El-Sherry *et al.*, 2014).

En la reorientación activa, como en la quimiotaxis y la termotaxis, los espermatozoides responden a estímulos externos ajustando sus patrones de latido flagelar. Tanto los espermatozoides de invertebrados marinos como los espermatozoides de mamíferos doblan sus flagelos de forma asimétrica y nadan hacia los quimioatrayentes en respuesta al estímulo químico. Del mismo modo, al girar en gradiente de temperatura, los espermatozoides doblan sus flagelos y manteniéndolos curvos inmóviles durante un período corto. Estos patrones asimétricos de batido flagelar son el resultado del movimiento deslizante de los microtúbulos regulado por calmodulina y  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo tanto, la respuesta activa de los espermatozoides siempre viene con señalización y oscilación de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . No obstante, para la reorientación de la reotaxis, no se conoce el comportamiento flagelar de los espermatozoides ni el papel del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Zhang *et al.*, 2016).

### 3.6.1. Reotaxis.

El apareamiento induce el flujo de líquido desde el oviducto al útero, los espermatozoides se alinean contra la dirección del flujo y nadan hacia el oviducto, fenómeno denominado como reotaxis. Si la reotaxis de los espermatozoides es un proceso pasivo dominado por la mecánica de fluidos o si los

espermatozoides detectan y se adaptan activamente al flujo de fluidos, sigue siendo un tema controvertido.

Una vez que los espermatozoides llegan al oviducto permanecerán en el RE y ocurre la ovulación, se genera una corriente de fluido por las células epiteliales ciliadas y la contracción tubárica que proporcionará un apoyo significativo al transporte del ovocito desde el ovario en dirección al istmo. Todo este incremento de fluido es detectado tanto por los espermatozoides capacitados como por los no capacitados que nadan en contra del flujo continuo, guiándolos hacia el ovocito (Miki & Clapham, 2013).

Miki y Clapham (2013) demostraron que los espermatozoides capacitados pueden nadar largas distancias en contra de la dirección de fluido, y curiosamente el 68% de los espermatozoides de ratones no capacitados y el 51% de los espermatozoides de humanos no capacitados respondieron de manera positiva al mecanismo de reotaxis en un medio viscoso. Sin embargo, la velocidad fue diferente ya que los espermatozoides no capacitados eran los más lentos. Un año más tarde, un estudio realizado en bovino, mostró que más del 80% de los espermatozoides nadaron en contra de la corriente respondiendo positivamente al mecanismo de la reotaxis (El-Sherry *et al.*, 2014). Por ese motivo, se piensa que la reotaxis es un mecanismo de guía que depende principalmente de la hiperactivación (Miki & Clapham 2013).

De manera similar, Kantsler *et al.* (2014), informaron que tanto los espermatozoides humanos como los de toro no solo nadan en contra de flujo, sino que lo hacen describiendo trayectorias en forma de espiral a lo largo de las paredes de un canal. Los espermatozoides tendían a seguir las paredes del canal, y los que se movían a lo largo de la pared, lo hacían más rápido que los que nadaban a lo largo de la línea central del canal (Romero-Aguirregomez corta *et al.*, 2018). Esta tendencia de las células móviles a permanecer cerca de las paredes y nadar a lo largo de los límites se denomina tigmotaxis (Denissenko *et al.*, 2012).

### 3.6.2. Termotaxis.

Una característica única de la termotaxis en los espermatozoides de mamíferos es la sensibilidad extrema a la temperatura que se manifiesta por la capacidad de los espermatozoides para responder a los cambios menores de  $0,0006\text{ }^{\circ}\text{C}$  a medida que nadan la distancia de su cuerpo.

En espermatozoides de mamíferos, la termotaxis parece ser un mecanismo esencial que guía a los espermatozoides liberados desde el sitio del reservorio más frío, hacia el sitio de fecundación más cálido. Los primeros estudios mostraron que, en la ovulación, existe una diferencia de temperatura entre el RE y el sitio de fecundación (más cálido). En conejos se vio que esta diferencia era de  $2^{\circ}\text{C}$  (David *et al.*, 1972). Años más tarde, en la especie porcina, se observó que esta diferencia de temperatura no era tan acusada ( $0,7^{\circ}\text{C}$ ) pero que también existía (Hunter & Nichol, 1986). Además, los cambios permanecen durante al menos 10h tras la ovulación (Bahat *et al.*, 2005). Estos hallazgos plantearon la posibilidad de que la diferencia de temperatura podría servir como una señal para guiar a los espermatozoides al sitio de fecundación (Hunter, 2009). Boryshpolets *et al.* (2015) mostraron que la respuesta de los espermatozoides de humanos capacitados, a un cambio rápido de temperatura involucra varios componentes. La elevación de la temperatura y el aumento de la viscosidad del tracto genital femenino afecta al flagelo de manera similar, es decir, ambos reducen la amplitud de onda del flagelo, lo que lleva a un desplazamiento de la cabeza de lado a lado más pequeño, una natación más lineal y probablemente un método más eficiente de propagación. Cuando el espermatozoide sube por el gradiente de temperatura, continúa nadando de forma bastante lineal, mientras que aumenta ligeramente su velocidad. Es probable que la velocidad modificada y el movimiento lineal persistan mientras la propagación de la célula suba por el gradiente. Por otro lado, a medida que baja la temperatura, el aumento de la amplitud de la onda flagelar conduce a un mayor desplazamiento de la cabeza de lado a lado y a una mayor frecuencia de giros. Esos resultados los llevaron a concluir que los espermatozoides dirigen su natación en un gradiente de temperatura modulando la frecuencia de

los giros (tanto los giros bruscos como los eventos de hiperactivación y los giros sutiles) y la velocidad, favoreciendo la natación en la dirección del gradiente.

La termotaxis parece ser un mecanismo de guía de largo alcance, adicional a la quimiotaxis, que parece ser de corto alcance y que probablemente ocurre cerca del ovocito y dentro de la masa del cumulus. Es probable que ambos mecanismos tengan una función similar, guiar los espermatozoides capacitados y listos para fecundar hacia el ovocito.

Se desconoce la identidad del sistema de detección que confiere esta sensibilidad excepcional a la temperatura por parte de los espermatozoides. Pérez-Cereales *et al.* (2015) mostramos que el sistema de detección de temperatura de los espermatozoides de mamíferos involucra opsinas, de las que se sabe que son receptores acoplados a la proteína G y que actúan como fotosensores en la visión. Estos autores mediante enfoques moleculares, inmunológicos y funcionales mostraron que las opsinas están presentes en los espermatozoides humanos y de ratón en sitios específicos, que dependen de la especie y el tipo de opsina, y que están involucradas en la termotaxis de los espermatozoides a través de dos vías de señalización: la fosfolipasa C y las rutas de nucleótidos cíclicos.

En cuanto a la población celular que responde a las diferencias en el gradiente de temperatura, aún está por determinar, aunque todos coinciden en que es un porcentaje bajo. En este sentido, Bahat *et al.* (2003) mostraron que solo del 3 al 5% de los espermatozoides de humanos y del 7 al 17% de los espermatozoides de conejo, pudieron detectar esta diferencia de temperatura *in vitro* y responder a ella por termotaxis. Estas cifras han sido reducidas recientemente por Pérez-Cereales *et al.* (2018), demostrando que menos del 1% de los espermatozoides humanos y de ratón fueron seleccionados por un sistema de termotaxis *in vitro*.

### 3.6.3. Quimiotaxis.

El proceso por el que las células se mueven hacia un gradiente de concentración creciente de una sustancia se denomina quimiotaxis. A mediados de la década de 1960, este fenómeno fue descrito en

espermatozoides de especies marinas como una forma de guía hacia el gameto femenino (Eisenbach, 1999). Más de tres décadas después, se reconoció también la quimiotaxis en espermatozoides de anfibios y mamíferos (Eisenbach & Giojalas, 2006). Parece ser que esta gran diferencia de tiempo para demostrar que la quimiotaxis se producía también en mamíferos, se debió a las conclusiones inconsistentes extraídas de los estudios iniciales como, la baja relación de señal-respuesta, condiciones experimentales subóptimas y la incapacidad de distinguir entre quimiotaxis verdadera de la acumulación de espermatozoides. Hoy se sabe que la baja relación señal/respuesta es causada por el hecho de que, en los mamíferos (a diferencia de la quimiotaxis en espermatozoides de especies marinas), solo una pequeña fracción de espermatozoides capacitados responde hacia un gradiente quimiotáctico.

Los primeros experimentos en mamíferos mostraron que los espermatozoides humanos se acumulaban en el FF (Villanueva-Diaz *et al.*, 1990), y que había una notable correlación entre esta acumulación *in vitro* y la fecundación del ovocito (Ralt *et al.*, 1991). Experimentos posteriores confirmaron que esta acumulación fue de hecho la consecuencia de la quimiotaxis (Ralt *et al.*, 1994). Por tanto, la quimiotaxis de los espermatozoides parece ser un mecanismo generalizado que guía a los espermatozoides hacia el ovocito, tanto cuando la fecundación es externa (como en las especies marinas) como interna (mamíferos).

El estudio de la quimiotaxis *in vitro* se llevó a cabo en diferentes especies, principalmente en la humana. En esta especie Cohen-Dayag *et al.* (1995) observaron que entre los espermatozoides capacitados había una población (2-12%) que respondían a los quimioatrayentes presentes en el medio. Igualmente, estudios realizados en espermatozoides congelados en bovino, se observó que una concentración parecida (10%) respondían al quimioatrayente (Gil *et al.*, 2008). Giojalas y Rovasio (1998) cuando evaluaron el tiempo que se requiere para que se produjese cambios en la motilidad de los espermatozoides de ratón en respuesta a factores del microambiente de ovocitos, el 10% de estos espermatozoides fueron capaces de responder positivamente. Sin embargo, un año más

tarde Oliveira *et al.* (1999) estudiaron la distancia recorrida por los espermatozoides de ratón hacia los quimioatrayentes y observaron que desde un 13 hasta un 24% de espermatozoides se dirigían hacia esos quimioatrayentes. En conejo, sin embargo, Fabro *et al.* (2002) observaron que el 23% de los espermatozoides respondían a la direccionalidad de los quimioatrayentes.

### 3.6.3.1. Señalización molecular durante el proceso quimiotáctico.

Los mecanismos moleculares de la quimiotaxis espermática son poco conocidos y están basados principalmente en estudios de espermatozoides de invertebrados marinos, en los que a diferencia de los mamíferos, la mayoría de los espermatozoides responden quimiotácticamente lo que facilita la medición de la respuesta (Gagnon, 1990).

Estudios realizados con espermatozoides de erizos (Kaupp *et al.*, 2003) y estrellas de mar (Matsumoto *et al.*, 2003), han propuesto un modelo en el que una vez que el quimioatrayente se une al receptor de quimiotaxis, una GC ubicada en el flagelo, se activa. En consecuencia, la concentración de GMPc aumenta de forma rápida y transitoria, y parece ser que este aumento transitorio da como resultado un aumento de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se sabe que esta elevación de  $\text{Ca}^{2+}$  provoca una mayor asimetría flagelar y una reducida linealidad. Dependiendo del momento de los picos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, el movimiento del espermatozoide se modifica para acercarse al quimioatrayente (Eisenbach & Giojalas, 2006).

La información disponible sobre los mecanismos moleculares de la quimiotaxis de espermatozoides en mamíferos es limitada y solo hace referencia a la identidad de algunos receptores de quimiotaxis y a los cambios de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por los quimioatrayentes. Walensky *et al.* (1995) propusieron un modelo para la transducción de señales en la quimiotaxis que implica la modulación de la AC o la fosfolipasa C por la proteína G acoplada al receptor. A medida que aumenta la concentración de AMPc, se estimulan los procesos de respiración y motilidad. Paralelamente, aumenta la concentración de inositol 1, 4, 5-trifosfato, lo que resulta en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la pieza intermedia del espermatozoide. La concentración elevada de  $\text{Ca}^{2+}$  resultante modula la motilidad de los

espermatozoides y probablemente media la respuesta quimiotáctica de los mamíferos (Cook *et al.*, 1994).

Un gradiente del precursor del péptido natriurético (NPPA) originado en el oviducto, induce la quimiotaxis de los espermatozoides al unirse a su receptor NPR1 y, posteriormente, entonces activa la vía PKG (Bian *et al.*, 2012). También el ON, producido en cantidades significativa por las células del cumulus, induce quimiotaxis en espermatozoides *in vitro* en la especie humana (Miraglia *et al.*, 2007). La vía de señalización propuesta implica la activación de GCs, síntesis de GMPc y la activación posterior de proteínas quinasas dependientes de GMPc.

El hallazgo de receptores olfativos acoplados a proteínas G en espermatozoides de mamíferos, y su localización en la parte media de la cola de espermatozoides, planteó la posibilidad de que algunas de estas proteínas pudieran ser receptores de quimiotaxis (Eisenbach & Giojalas, 2006). Se identificaron dos receptores olfativos distintos: OR17-4 (también conocido como OR1D2) en los flagelos de espermatozoides humanos (Spehr *et al.*, 2003) y OR23 en espermátidas redondas de ratón (ubicación exacta aún no determinada) (Fukuda *et al.*, 2004) y se descubrió que sus respectivos ligandos, bourgeonal y lylal eran quimioatrayentes espermáticos. Parece ser que el mecanismo por el que actúan estos agentes quimiotácticos es por la activación de una AC situada en la membrana del flagelo (Spehr *et al.*, 2004).

En humano, ABHD2 es un receptor de P4 no genómico que mantiene abierto el canal catiónico CatSper. Cuando la P4 se une a su receptor se elevan los niveles  $Ca^{2+}$  y se desencadena la motilidad hiperactiva la cual es necesaria para atravesar la ZP (Arnoult *et al.*, 2011). ABHD2 se expresa altamente en espermatozoides, se une a la P4 y actúa como una hidrolasa lipídica dependiente de P4 que hidroliza el endocannabinoide 2-araquidonoilglicerol (2AG) de la membrana plasmática. El 2AG inhibe el canal de  $Ca^{2+}$  de los espermatozoides (CatSper), por tanto, su eliminación conduce a la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de CatSper produciendo la activación de los espermatozoides (Miller *et al.*, 2016).

Allurin, un quimioatrayente de espermatozoides secretado de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*, se une al espermatozoide del ratón actuando como quimioatrayente (Kaupp *et al.*, 2008).

Rantes (regulado por la activación de las células T normales expresadas y secretadas) es una pequeña proteína de 68 aminoácidos. Esta quimiocina es un quimioatrayente para eosinófilos, monocitos y linfocitos T (Schall *et al.*, 1990; Alam *et al.*, 1993;), así como para espermatozoides de humanos (Isobe *et al.*, 2002). En las células somáticas, varios receptores de quimiocinas, por ejemplo, CCR1, CCR3, CCR4 y CCR5, median la actividad quimiotáctica de Rantes (Appay & Rowland-Jones, 2001). Los receptores CCR3 y CCR5 también se han identificado en espermatozoide humano (Muciaccia *et al.*, 2005). Sin embargo, la vía de señalización es desconocida.

Actualmente solo se han reconocidos algunos de los receptores que se unen a los quimioatrayentes, y las vías de transducción de las señales involucradas en la quimiotaxis no han sido aclaradas en su mayoría. Además, todas las conclusiones sobre la función y la ubicación de la quimiotaxis de los espermatozoides se han alcanzado solo a partir de experimentos *in vitro* y, por lo tanto, esperan su verificación *in vivo* (Eisenbach & Giojalas, 2006).

### 3.6.3.2. Fluidos biológicos como quimioatrayentes.

El FO contiene varios quimioatrayentes que podrían ser secretados a lo largo del oviducto de manera secuencial (Oliveira *et al.*, 1999). A medida que los espermatozoides se acercan al sitio de fecundación, probablemente perciben un gradiente de quimioatrayente que se origina en las células del cumulus (Sun *et al.*, 2005) y que los guía al COC. Posteriormente, los espermatozoides deben atravesar las células del cumulus para lo cual nuevamente deben ser guiados. Parece que es el propio ovocito el que genera el gradiente quimiotáctico dentro de la matriz del cumulus para guiar a los espermatozoides hacia el ovocito (Sun *et al.*, 2005).

De los fluidos reproductivos más estudiados como quimioatrayentes, tenemos el FF (Eisenbach, 1999), el cual contiene las secreciones preovulatorias del ovocito así como de las células que le

rodean. La quimiotaxis ejercida por los componentes del FF, demostrada para espermatozoides humanos (Ralt *et al.*, 1994), ratones (Oliveira *et al.*, 1999) y conejos (Fabro *et al.*, 2002), parece estar altamente correlacionada con la posibilidad de fecundar al ovocito, al menos en humanos (Ralt *et al.*, 1991). Sin embargo, es poco probable que la quimiotaxis del FF también ocurra *in vivo* (Sun *et al.*, 2005), para ello se requeriría un suministro continuo de quimioatrayente y el FF solo se libera como un evento único en la ovulación.

Está bien establecido que el FF ejerce un efecto significativo sobre la motilidad y otras funciones de los espermatozoides de mamíferos. Shuang-Lin *et al.* (1994) investigaron sobre la proteína estimuladora de la motilidad de los espermatozoides en el FF. Esta proteína posee una secuencia de aminoácidos N-terminal similar a la del antitrombina III (AT III) porcina y podría inhibir la coagulación sanguínea y la actividad proteolítica de la trombina y la tripsina (Lee *et al.*, 1992). Después de ser parcialmente digerida con papaína, tripsina o proteasa K, la proteína estimuladora de la motilidad del espermatozoide y AT III porcina mostraron los mismos mapas de péptidos (Lee *et al.*, 1992). Por lo tanto, demostraron que la proteína estimuladora de la motilidad de los espermatozoides en el FF porcino es AT III que se transporta desde el sistema de circulación sanguínea, que estimula la motilidad de los espermatozoides y que es un quimioatrayente de espermatozoides (Shuang-Lin *et al.*, 1994).

La quimiocina Rantes de 8 kDa ha sido demostrado ser un potente quimioatrayente para eosinófilos, monocitos, linfocitos T (Schall *et al.*, 1990; Alam *et al.*, 1993) y para espermatozoides humanos. Se sabe que esta quimiocina está presente en el FF, y el ARNm para su receptor se ha encontrado en los espermatozoides humanos (Isobe *et al.*, 2002). Rantes es producido por las células de la granulosa dentro del folículo en los ovarios, antes de la ovulación, y su producción está regulada por incremento en algunas enfermedades asociadas con infertilidad (Isobe *et al.*, 2002).

El PNA es una hormona polipeptídica que se secreta, entre otro lugares, en la porción atrial del corazón que activa la GC (Brenner *et al.*, 1990; Ruskoaho, 1992). El PNA está presente en el FF

humano (Sundsfjord *et al.*, 1989) y se han identificado receptores específicos de PNA en los espermatozoides humanos (Silvestroni *et al.*, 1992). Aunque se ha demostrado quimiotaxis de espermatozoide para PNA (Zamir *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1995) no se sabe si PNA está involucrado en la quimiotaxis de espermatozoide *in vivo* (Eisenbach & Giojalas, 2006).

El FF y FO mejoran la motilidad de los espermatozoides e inducen una respuesta quimiotáctica, sin embargo, se desconoce la importancia de esto *in vivo* (Oliveira *et al.*, 1999). Parece ser que cuando los espermatozoides alcanzan el oviducto, el FO aumenta su motilidad y los dirige quimiotácticamente hacia el sitio de almacenamiento del istmo. Posteriormente, cuando los espermatozoides capacitados se desprenden del RE, el FF aumenta su velocidad y dirige los gametos masculinos quimiotácticamente hacia el área de la ampolla para contactar el óvulo (Oliveira *et al.*, 1999).

El COC secreta como principal quimioatrayente la P4. Se sabe que un gradiente de concentración picomolar (pM) de la P4 es suficiente para atraer los espermatozoides (Teves *et al.*, 2009). La P4 forma un gradiente de concentración estable a lo largo del *cumulus oophorus* (Teves *et al.*, 2006; Guidobaldi *et al.*, 2008) e induce la quimiotaxis de espermatozoides (Spehr *et al.*, 2004). Guidobaldi *et al.* (2008) propusieron que la P4 era el único quimioatrayente secretado por las células del cumulus, no obstante, actualmente aún no se sabe si las células del cumulus secretan otros quimioatrayentes distintos de la P4. Aun así, parece que la secreción de la P4 por parte de estas células podría explicar la falta de especificidad en la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de mamífero al FF o al MC (fluido que se obtiene después de la maduración *in vitro* de los COCs) (Sun *et al.*, 2003).

**HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



#### 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En este trabajo se plantearon dos hipótesis:

1.- Los biofluidos reproductivos, fluido folicular, fluido oviductal y medio condicionado, en la especie porcina, tanto de manera individual como en su conjunto, tienen efectos quimiotácticos y son dependientes de la concentración.

2.- La selección de espermatozoides por parte de los biofluidos modifica las características bioquímicas y funcionales de los espermatozoides, por lo que mejoran la calidad embrionaria tras la fecundación *in vitro*.

Con el propósito de desarrollar estas hipótesis planteamos los siguientes objetivos:

1. Determinar la capacidad quimiotáctica y concentración óptima de los biofluidos (fluido folicular, fluido oviductal y medio condicionado) sobre espermatozoides porcinos.
2. Realizar un estudio comparativo de las características funcionales y bioquímicas de los espermatozoides que responden o no a factores quimiotácticos.
3. Analizar componentes en los biofluidos responsables de la actividad quimiotáctica.
4. Determinar si existe relación entre la calidad embrionaria y los espermatozoides que respondieron al quimioatrayente fluido folicular.



**MATERIALES Y MÉTODOS**



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Materiales

Todos los instrumentos, reactivos y soluciones empleados para la realización de los experimentos vienen descritos en las tablas 1-8.

Tabla 1. Aparatos utilizados para llevar a cabo las diferentes técnicas.

Aparatos	Casa comercial
Balanza de precisión	Ohaus
Cámara de Burker para recuento celular	Rogo Sampaic
Cámara de Neubauer para recuento celular	VWR Internacional
CASA ( <i>Computer Assisted Semen Analysis</i> )	PROiSER R+D S.L.
Centrifuga 5810R	Eppendorf
Incubador de CO <sub>2</sub>	Heraeus instruments
Microscopio de contraste de fase	Leica DMR
Microscopio estereoscópico SMZ800	Nikon
Microscopio de fluorescencia	Leica DMR
Placa calefactora	IbfTech
pH-metro	Crison
SpermaCue	Minitub Iberica SL
Termobloque	Labnet Internacional Inc

Tabla 2. Reactivos utilizados.

Reactivos	Casa comercial
BTS ( <i>Betsville Thawing Solution</i> )	Gestión Veterinaria Porcina (GVP)
PBS ( <i>Phosphate Buffer Solution</i> )	Sigma-Aldrich
Gluteraldehído	Sigma-Aldrich
Percoll®	GE Healthcare
PNA-FITC	Sigma-Aldrich
Kit Halomax	HALOTECH DNA SL.
DAKO	Dako North America, Inc.
Naranja de acridina	Sigma-Aldrich
Etanol	Panreac
SYBR Green	Thermo Scientific
Formaldehido	Fluka

Tabla 3. Otros reactivos utilizados durante la experimentación.

Anticuerpos	Casa comercial
Anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina	Millipore
Anticuerpo anti-ratón conjugado con	Bio-Rad Laboratories
Antagonistas del canal Ca <sup>2+</sup> tipo-T	Casa comercial
NNC 550396	Sigma-Aldrich

Tabla 4. Soluciones y preparación utilizadas durante la experimentación.

Soluciones	Composición
Hoechst Stock	1 mg de Hoechst B-2261 en 1 mL de H <sub>2</sub> O
Tinción de Hoechst	50 mL PBS (con PVA 0,2 g/L) + 250 µL de
Medio de montaje	25 mL PBS + 25 mL Glicerol + 25 µL de
Cetab stock	5 g cetrimida en 25 mL etanol + 475 mL
Cetab	20 mL cetrimida stock en 500 mL de agua
Solución salina fisiológica	9g/L NaCl + 0,2 g sulfato de kanamicina
Solución salina formulada	1 mL formaldehido en 100 mL de solución
PBS-PVA 2% (p/v)	0,1 g PVA en 500 mL PBS
Percoll® 90% (v/v)	1 M KCl + 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 1 M CaCl <sub>2</sub> +
Percoll® 45% (v/v)	1 mL Percoll 90% + 1 mL BTS (v/v)
Solución Hiposmótica	0,675 g/L de D-fructosa + 0,268 g/L de
Solución de Carnoy	1:3 ácidoacético:metanol
Buffer de tinción	0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 1 mM EDTA + 0,15 M

Salvo que se indique lo contrario los reactivos empleados para la preparación de las diferentes soluciones proceden de la casa comercial Sigma-Aldrich Química S.A (Madrid, España).

A continuación, se muestra la composición de los medios de maduración, fecundación y cultivo de embriones *in vitro*. Los medios se prepararon con agua ultrapura (18 MΩ cm; Milli-Q, Millipore Co., Billerica, MA, EE. UU.) en condiciones de esterilidad, bajo una cabina de flujo laminar horizontal (BH-100 TELSTAR®), posteriormente se esterilizaron por filtración (0,22 µm). El mismo día del uso, se suplementaron y se volvieron a filtrar (0,22 µm). Al menos 2h antes del uso, los medios fueron incubados al 5% CO<sub>2</sub>, 38,5 °C y humedad a saturación.

Tabla 5. Composición del medio TALP para incubación de espermatozoides y fecundación *in vitro*.

Componentes	Concentración (mM)
NaCl (S-9888)	114,06
KCl (P-5405)	3,20
MgCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O (M-2393)	0,50
Lactato sódico (L-7900)	18,00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O (S-9638)	0,35
Glucosa (G-7021)	5,00
NaHCO <sub>3</sub> (S-5761)	25,07
Cafeína (C-0750)	2,00
Lactato cálcico-5H <sub>2</sub> O (C-8536)	8,00
PVA (P-8136)	1mg/mL
Kanamicina (K-1377)	0,17
Rojo fenol (Panreac 171615)	0,003

El día de su uso, el medio TALP fue suplementado con BSA 3 mg/mL (A-9647) y piruvato sódico 0,11 mM (P-2256).

Tabla 6. Composición del medio de maduración *in vitro* de ovocitos (NCSU 37).

Componentes	Concentración (mM)
NaCl (S-5886)	108,73
NaHCO <sub>3</sub> (S-5761)	25,07
KCl (P-5405)	4,78
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (P-5655)	1,19
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O (M-1880)	1,19
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O (C-7902)	1,70
Glucosa (G-7021)	5,55
Glutamina (G-8540)	1,00
D-Sorbitol (S-3889)	12,00
Penicilina G (P-3032)	-
Estreptomicina (S-9137)	-

El día de su uso, 100 mL de NCSU 37 de la solución stock se suplementó con: 0,57 mM cisteína (C-7352), 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoetanol (M-7522), 5 mg/mL insulina (I-6634) y 10% (v/v) de fluido folicular porcino.

Tabla 6.1. Suplemento al medio de maduración para las primeras 22h.

Componentes	Concentración
eCG	10 UI/mL
HCG	10 UI/mL
dbAMPc (Fluka 34988)	1 mM

eCG: Gonadotropina coriónica de yegua preñada, HCG: gonadotropina coriónica humana; dbAMPc: dibutilil adenosin monofosfato cíclico.

Tabla 7. Composición del medio de cultivo *in vitro* de embriones porcinos (NCSU 23 A y B).

A) Medio utilizado durante las primeras 48h de cultivo embrionario.

Componentes	Concentración (mM)
NaCl (S-5886)	108,73
NaHCO <sub>3</sub> (S-5761)	25,07
KCl (S-5405)	4,78
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (P-5655)	1,19
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O (M-1880)	1,19
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O (C-7902)	1,70
Piruvato sódico (P-2256)	0,5
Lactato sódico (L-7900)	5,0
L-Glutamina (G-8540)	1,00
Taurina (T-7146)	7,00
Penicilina G (PEN-K)	0,1 IU/L
Estreptomycin (S-9137)	0,034

B) Medio utilizado durante las 48-168h de cultivo embrionario.

Componentes	Concentración (mM)
NaCl (S-5886)	108,73
NaHCO <sub>3</sub> (S-5761)	25,07
KCl (S-5405)	4,78
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (P-5655)	1,19
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O (M-1880)	1,19
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O (C-7902)	1,70
D-Glucosa (P-7021)	5,55
L-Glutamina (G-8540)	1,00
Taurina (T-7146)	7,00
Penicilina G (PEN-K)	0,1 IU/L
Estreptomicina (S-9137)	0,034

El día de su uso, 100 mL de NCSU 23 A y B de las soluciones stock se suplementaron con 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoetanol (M-7522), 5 mg/mL insulina (I-6634). Finalmente, sólo el volumen necesario para el experimento se suplementó con los componentes descritos en la tabla 8.

Tabla 8. Suplementos para el medio de cultivo embrionario.

Componentes	Concentración
Hipotaurina (H-1384)	5,00 mM
BSA-FAF (A-6003)	0,4% (p/v)
MEM (M-7145)	1% (v/v)
BME (B-6766)	2% (v/v)

## 5.2. Métodos

### 5.2.1. Ética.

El estudio se realizó siguiendo la Política Española de Protección Animal RD 53/2013, que cumple con la Directiva 2010/63/UE de la Unión Europea sobre protección animal. Todos los procedimientos realizados en este trabajo fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia y por el Servicio de Producción Animal del Departamento de Agricultura de la Región de Murcia (España). Código CEEA: 469/2018.

### 5.2.2. Obtención de biofluidos.

#### 5.2.2.1. Obtención del fluido folicular.

Los ovarios procedían de hembras prepúberes de 6 meses de edad entre 100-110 kg del matadero local “El Pozo”, de la empresa CEFUSA, Alhama Murcia. Una vez separados del resto del genital de la hembra fueron depositados en un recipiente isoterma que contenía solución salina fisiológica (SSF) a 38,5 °C suplementada con 100 µg/mL de sulfato de kanamicina. Aproximadamente en el plazo de 1h llegaron al laboratorio donde fueron lavados con solución de cetrimida (cetab) al 0,04% (w/v) y con SSF. Posteriormente, se procedió a la aspiración de los folículos antrales de 3 a 6 mm de diámetro con la ayuda de una aguja de 18G acoplada a una jeringuilla de 10 mL (Fig. 3 a). El FF junto con los ovocitos aspirados se dejó sedimentar durante 5 min en un tubo estéril. Trascurrido este tiempo se separó el sobrenadante (liquido folicular) del sedimento (ovocitos y restos celulares).

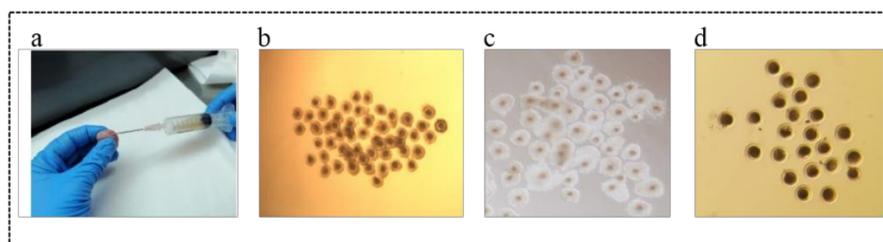


Figura 3. a) Método para la aspiración de los folículos. b) ovocitos inmaduros rodeados por varias capas de las células del *cumulus*. c) ovocitos maduros con el *cumulus* expandido y d) ovocitos decumulados.

#### 5.2.2.2. Obtención del fluido oviductal.

El fluido oviductal (FO) se obtuvo de oviductos de cerdas cíclicas en fase periovulatoria sacrificadas en matadero. Los oviductos se transportaron al laboratorio en hielo dentro de los 30 min posteriores al sacrificio. Antes del inicio de la aspiración del fluido oviductal, los oviductos se lavaron con solución de cetrimida al 0,4% (v/v) y dos veces en solución salina. Seguidamente se disecaron sobre placas de Petri asentadas en hielo. Una vez disecados, el FO se recogió por aspiración con una pipeta automática introduciendo una punta de pipeta de 200  $\mu$ L en la ampolla y haciendo manualmente un gradiente de presión creciente desde el istmo a la ampolla. Todo el fluido aspirado de los oviductos se depositó en eppendorf y se centrifugó a 7000 g durante 10 min a 4 °C y se almacenó en alícuotas de 10  $\mu$ L a -20 °C hasta el momento de su uso.

#### 5.2.2.3. Obtención del medio condicionado.

El medio condicionado (MC) se obtiene después de la maduración *in vitro* de los COCs tal y como se describe en el apartado 5.2.5. Para ello se procedió a la centrifugación del contenido del medio de maduración con los COCs incluidos. Posteriormente, se centrifugó a 7000 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se alicuotó en volúmenes de 10  $\mu$ L y se congeló a -20 °C hasta el momento de su uso.

#### 5.2.3. Obtención del semen y análisis de la funcionalidad espermática.

El semen se obtuvo de verracos adultos de fertilidad probada procedentes del centro de inseminación n° 2 CEFUSA situado en Alhama de Murcia, con edades comprendidas entre 12 y 36 meses. La recogida de semen se realizó mediante el método manual y solamente se recogió la fracción rica del eyaculado. 10 mL de la muestra seminal se transportó desde el centro de inseminación a los laboratorios de la Facultad de Veterinaria en un recipiente isoterma y protegido de la luz.

Una vez en el laboratorio, se procedió a evaluar la calidad espermática mediante un análisis seminal básico. Se determinó la concentración de las muestras seminales utilizando un espectrofotómetro para

recuento de espermatozoides porcinos (SpermaCue). Motilidad y calidad de movimiento y formas anormales, se observaron bajo microscopía óptica. Todos los parámetros se encontraban dentro de la normalidad.

#### 5.2.3.1. Procesado espermático.

El eyaculado fue separado del plasma seminal mediante el lavado a través de un gradiente discontinuo de Percoll® de dos bandas 45/90. Para ello se depositaron 2 mL de Percoll® 90 (Tabla 4) en un tubo cónico de 10 mL y sobre el otros 2 mL de Percoll® 45 (Tabla 4) y finalmente se añadió 500 µL de la muestra seminal (Fig. 4). Luego, las muestras se centrifugaron durante 30 min a 700 g a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 10

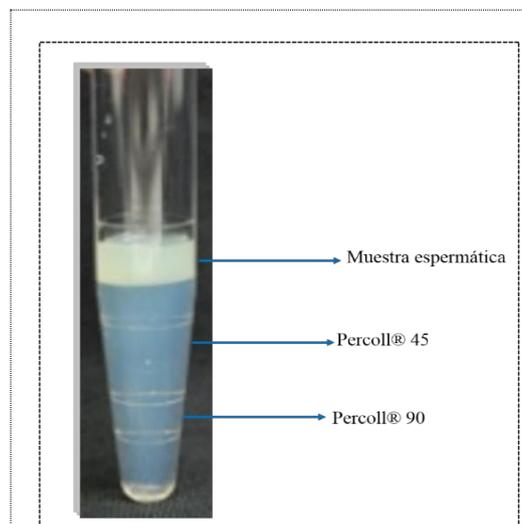


Figura 4. Imagen del gradiente discontinuo de densidad Percoll® de dos bandas 45/90 con la muestra seminal.

mL de TALP. A continuación, se realizó otra centrifugación, durante 5 min a 700 g a temperatura ambiente. Finalmente, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en TALP ajustando la concentración a  $20 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

#### 5.2.3.2. Dispositivo para el estudio de los quimioatrayentes.

Para evaluar el proceso de quimiotaxis se utilizó un dispositivo diseñado en el Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia. El dispositivo para seleccionar espermatozoides consistió en un sistema que dispone de dos pocillos, a los que denominaremos A y B para la mejor descripción del proceso (Fig. 5). Dichos pocillos están conectados por un capilar fijo. Además, cada pocillo dispone de un tapón que garantiza la estanqueidad de los medios utilizados. El funcionamiento del dispositivo se llevó a cabo de la siguiente manera. Se destapó el pocillo B, mientras el A permaneció cerrado, en dicho pocillo se depositó 500 µL de TALP suplementados o no con los quimioatrayentes correspondientes. Posteriormente, se procedió a cerrar el pocillo B, y se

destapó el pocillo A, donde se depositaron  $20 \times 10^6$ /mL de espermatozoides diluido en 500  $\mu$ L de TALP previamente lavado en el gradiente de Percoll®.

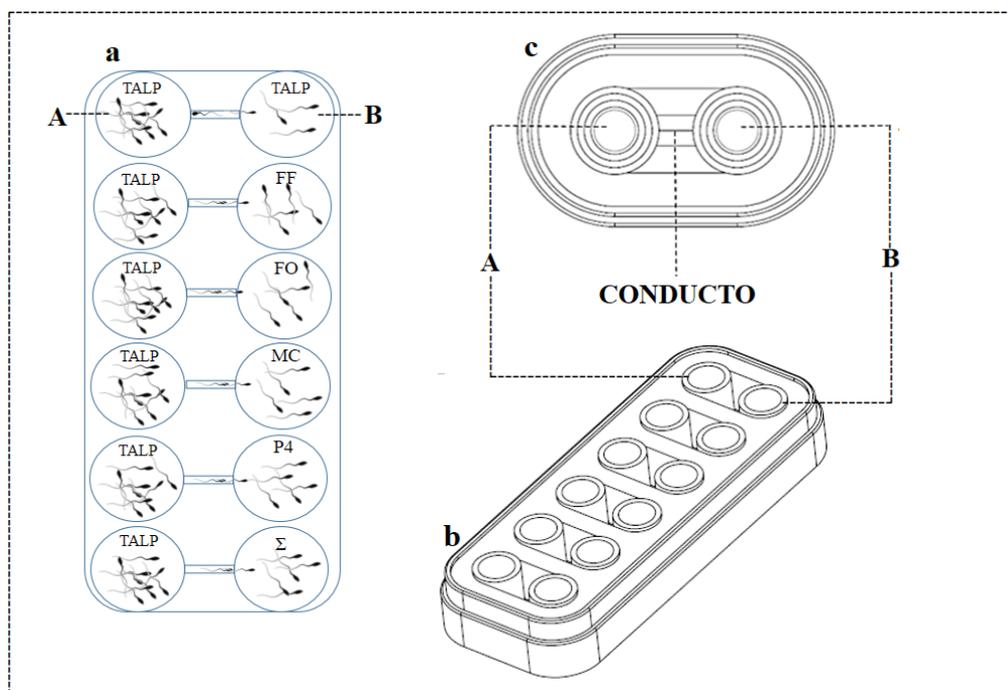


Figura 5. a) Dispositivo diseñado para la selección de espermatozoides mediante quimioatrayentes. Sistema con dos pocillos (A y B) conectados por un capilar fijo. b) Representación en alzado de una realización particular del dispositivo en la que se pueden distinguir 12 compartimentos (6A, 6B). c) Vista superior del dispositivo en la que se ven las aperturas (A, B) de cada uno de los dos compartimentos y el conducto (capilar fijo) que une dichos compartimentos o pocillos.

#### 5.2.3.3. Concentración espermática.

Para determinar la concentración espermática de los espermatozoides que migraron, se preparó una dilución 1:100 de espermatozoides en una solución salina formolada al 0,3%. Posteriormente con una cámara de recuento celular se calculó la concentración. Por cada muestra a evaluar se realizó doble recuento. El motivo de utilizar una cámara de recuento y no el espectrofotómetro, se debe a la falta de sensibilidad de este último cuando la concentración espermática se encuentra con valores por debajo de  $50 \times 10^6$  células/mL.

#### 5.2.3.4. Evaluación de la motilidad de los espermatozoides.

La motilidad espermática fue evaluada con la ayuda del sistema computarizado CASA. Para ello se utilizó un microscopio de contraste de fase (objetivo de pH negativo 10x; Leica DMR) y una cámara

digital (BaslerVision) conectado con el software ISAS® (PROiSER R + D SL, Valencia, España). 4  $\mu\text{L}$  de la muestra fueron depositados en una cámara precalentada a 38°C (cámara Spertrack® de 20 micras, Proiser R + D, SL) y se registraron al menos tres campos por muestra. Los parámetros de configuración de CASA utilizados fueron 25 cuadros por segundo y un área de tamaño de partículas entre 10 y 80  $\mu\text{m}^2$ . La trayectoria de los espermatozoides se clasificó en tres categorías: lenta (10-25  $\mu\text{m/s}$ ), intermedia ( $> 25$ -45  $\mu\text{m/s}$ ), rápida ( $> 45$   $\mu\text{m/s}$ ). Los parámetros evaluados fueron: motilidad total (%), motilidad progresiva (%); velocidad curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidad media (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidad rectilínea (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), desplazamiento lateral de la cabeza espermática (ALH,  $\mu\text{m}$ ), índice de linealidad (LIN, relación de VSL/VCL, %), índice de rectitud (STR, relación de VSL/VAP, %), el coeficiente de oscilación (WOB, %) y la frecuencia de batido de la cabeza (BCF, Hz).

#### 5.2.3.5. Localización de la fosforilación de tirosina mediante inmunofluorescencia indirecta.

Para la localización de las proteínas fosforiladas en tirosina de los espermatozoides porcinos, se utilizó la inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Matás *et al.*, 2011). Los espermatozoides se fijaron con paraformaldehído al 2% (v/v) durante 1h a 4°C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 700 g durante 10 min a 4°C y se resuspendieron en 500  $\mu\text{L}$  de albúmina de suero bovino (BSA) al 4% (w/v) para bloquear los sitios de unión no específicos. Transcurridas 12h, se procedió al lavado de las muestras en PBS mediante centrifugación. Seguidamente, se realizaron extensiones sobre portaobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente. Una vez secas, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal anti-fosfotirosina durante 1h a 4°C a una dilución 1:300. Para eliminar el exceso de anticuerpo, las muestras se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con fluoresceína (FITC) a una dilución 1:400 durante 1h a 4°C. Finalmente, se lavaron los portaobjetos con PBS y se montó con el medio de montaje Dako® para su análisis bajo microscopio de epifluorescencia, con objetivo de 100x. El control negativo se realizó incubando la muestra exclusivamente con anticuerpo secundario. Se contaron un total de 100

espermatozoides por muestra y se clasificaron de acuerdo a la señal fluorescente en la región acrosomal, región postacrosomal, o ambas (región acrosomal y postacrosomal) (Fig. 6 a, b, c).

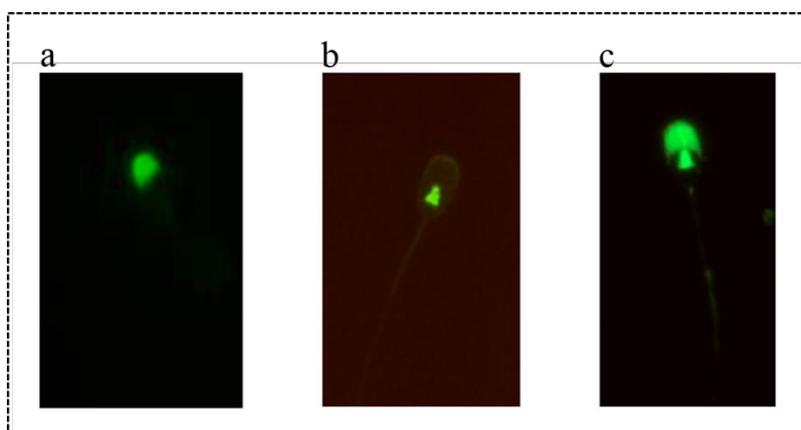


Figura 6. Imagen de microscopía de fluorescencia donde se puede observar la fosforilación de tirosina la región acrosomal (a), postacrosomal (b) y ambas (acrosomal y postacrosomal).

#### 5.2.3.6. Evaluación de la integridad del acrosoma espermático.

Para evaluar la integridad de la membrana acrosomal de los espermatozoides, 250  $\mu\text{L}$  de la muestra se incubó en una solución que contenía 10  $\mu\text{L}$  de solución salina formolada (0,3% v/v) y 10  $\mu\text{L}$  de isoticianato de fluoresceína (FITC) conjugado con la lectina PNA (*Arachishypogaea*) (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Después de 10 min de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se evaluaron un total de 200 células espermáticas en un microscopio de epifluorescencia (Fig. 7).

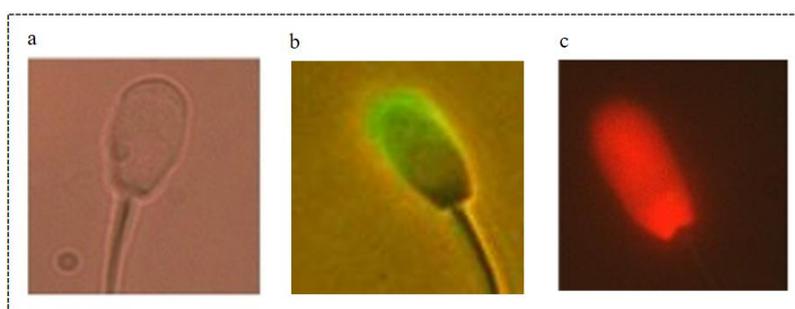


Figura 7. Imagen de microscopía de fluorescencia donde se observa el estado del acrosoma. a) espermatozoide vivo con acrosoma intacto (sin fluorescencia), b) espermatozoide vivo con acrosoma reaccionado (fluorescencia verde) y c) espermatozoide muerto (florescencia roja).

### 5.2.3.7. Test hipoosmótico (hypoosmotic swelling-test) para espermatozoides porcinos.

La prueba hipoosmótica de los espermatozoides se determinó siguiendo el protocolo descrito por Jeyendran *et al.* (1984). Para ello 250  $\mu\text{L}$  de la muestra se incubó con 2,50 mL de la solución hipoosmótica durante 20 min a  $37^\circ\text{C}$ . Transcurrido ese periodo de tiempo, 200 espermatozoides se evaluaron bajo microscopio de contraste de fase (100x). Los espermatozoides que habían reaccionado a la solución hipoosmótica mostraron parte de su flagelo enrollado o doblado (Fig. 8).



Figura 8. Imagen de microscopía de contraste de fase donde se puede observar espermatozoides que han reaccionado a la solución hipoosmótica mostrando parte del flagelo enrollada (flecha).

### 5.2.3.8. Inhibición de la entrada de calcio al espermatozoide.

Para inhibir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en los espermatozoides se utilizó el compuesto NNC 55-0396. Este compuesto es un inhibidor altamente selectivo del canal  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-T y bloquea la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por tanto, disminuye el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva. Para evaluar el efecto de la inhibición de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en los espermatozoides, se adicionó a la muestra espermática diluida en TALP ( $20 \times 10^6$  células/mL) 2  $\mu\text{M}$  de NNC 55-0396. Seguidamente, la muestra se incubó durante 10 min y se depositó en el pocillo A (Fig. 5). Pasado 20 min de incubación, se evaluó la concentración espermática del pocillo B (Fig. 5) con la ayuda de la cámara de conteo celular. Paralelamente se realizó un control sin la presencia del inhibidor.

### 5.2.3.9. Evaluación de la fragmentación del ADN espermático.

La evaluación de la fragmentación del ADN se realizó con el fluorocromo naranja de acridina y el test de dispersión de la cromatina espermática (SCDT) mediante el kit Halomax®.

#### *i) Ensayo con naranja de acridina:*

Para realizar el ensayo se depositaron 30  $\mu\text{L}$  de la muestra sobre un portaobjetos, seguidamente se realizó una extensión y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente se depositaron 70  $\mu\text{L}$  de la solución de Carnoy dejando incubar esta preparación al menos 2h en una cámara húmeda a 4°C. Después se lavó con PBS y se añadió 200  $\mu\text{L}$  del buffer de tinción con 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de naranja de acridina. Las muestras se incubaron en oscuridad durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se lavaron de nuevo con PBS y se añadió el medio de montaje Dako®. El grado de fragmentación del ADN espermático de las muestras se midió mediante un microscopio de epifluorescencia iluminando la muestra con luz azul (a 460 nm) con objetivo de 40x. El naranja de acridina tiene la capacidad de intercalarse entre la doble cadena de ADN, que al ser excitado emite color verde, mientras que presenta una emisión en color anaranjado si se incorpora al ADN de cadena sencilla (Fig. 9).

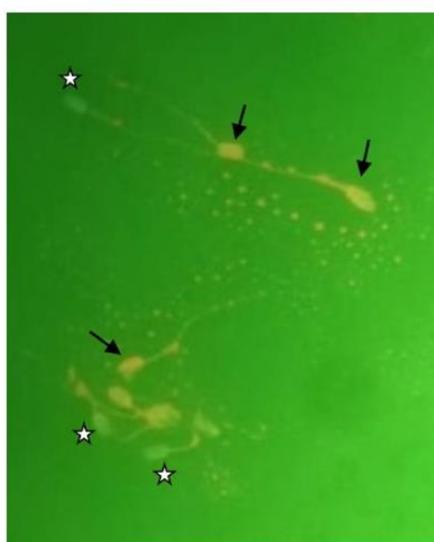


Figura 9. Espermatozoides visualizados bajo microscopía de fluorescencia tras ser tratados con naranja de acridina. Se observan espermatozoides de color verde, con ADN sin fragmentar (estrella) y espermatozoides con un color anaranjado con ADN fragmentado (flecha).

*ii) Test de dispersión de la cromatina espermática:*

El Test de dispersión de la cromatina espermática (SCDT) es una técnica utilizada para medir la fragmentación del ADN mediante el kit Halomax®. El primer paso consistió en calentar el gel de agarosa (proporcionado por el kit) durante 5 min a 100 °C y, seguidamente, se atemperó a 38°C durante al menos 5 min. En este momento se realizó la mezcla de 10 µL de agarosa fundida con 5 µL de cada una de las muestras y, rápidamente se depositaron 5 µL en un portaobjetos tratado. Seguidamente las preparaciones se cubrieron con los cubreobjetos y se dejaron enfriar durante 10 min a 4°C. Transcurrido este tiempo, los cubreobjetos fueron retirados y se adicionó a los microgeles una gota de la solución de lisis (proporcionada por el kit). Se dejó actuar durante 5 min y se realizó el lavado de las muestras con agua destilada durante 10 min. Pasado este tiempo, las muestras fueron deshidratadas mediante pasos sucesivos por etanol en los siguientes porcentajes: 70%, 90% y 100% (v/v). En cada porcentaje de etanol la muestra se mantuvo durante 2 min y a continuación se dejó secar. Finalmente, las muestras se tiñeron con 2 µL del fluorocromo SYBR Green. El grado de fragmentación del ADN espermático se midió mediante un microscopio de epifluorescencia (a 498 nm), con objetivo de 40x, iluminando la muestra con luz azul. Los espermatozoides con ADN fragmentado desarrollan halos grandes de cromatina dispersada alrededor de la cabeza del espermatozoide, mientras que aquellos que contienen ADN no fragmentado muestran cabezas compactas o cabezas con solo un halo pequeño (Fig. 10).

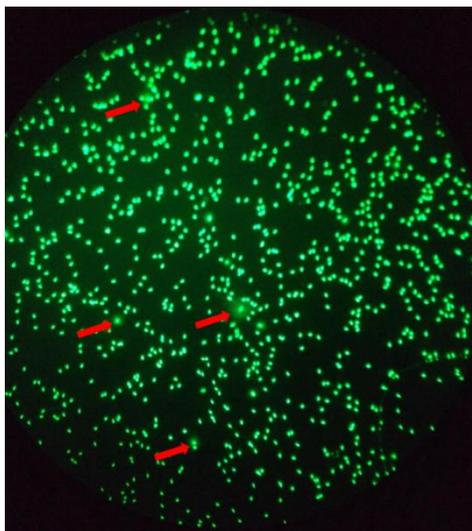


Figura 10. Espermatozoides visualizados mediante microscopía de fluorescencia tras la realización del test de dispersión de la cromatina espermática mediante el kit Halomax®. Se puede observar cabezas de espermatozoides sin halo con ADN sin fragmentar y espermatozoides con un gran halo alrededor de la cabeza que se corresponde con ADN fragmentado (flecha).

#### 5.2.3.10. Análisis de las proteínas y metabolitos en los biofluidos mediante HPLC-MS.

##### *i) Medición de proteínas de FF, FO y MC mediante técnicas HPLC-MS/MS.*

La medición de las proteínas presentes en los biofluidos (FF, FO y MC) se realizó mediante análisis HPLC-MS/MS en el laboratorio de Proteómica de la Sección de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia. Para realizar la medición es necesario, en primer lugar, la digestión de la muestra con tripsina y posteriormente se realiza análisis por HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS.

##### *1) La digestión con tripsina.*

La digestión de las muestras se hizo siguiendo el procedimiento estándar de la Sección de Biología Molecular del Área Científica y Técnica de Investigación de la Universidad, Universidad de Murcia. Las muestras se disolvieron en 100  $\mu$ L de tampón bicarbonato de amonio 50 mM, pH 8,5 con ProteaseMax al 0,01% (p/v) (Promega). Las muestras de proteínas se redujeron añadiendo 20 mM de ditiotretitol (DTT) a 56°C durante 20 min. Luego, se añadieron 100 mM de agente alquilante, iodoacetamide durante 30 min, a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalmente, la digestión se realizó agregando 1  $\mu$ g de *Trypsin Gold Proteomics Grade* (Promega) (aprox. 1: 100 p/p) durante 3h

a 37°C. La reacción se detuvo con ácido fórmico al 0,1% (v/v) y la solución se filtró a través de filtros de 0,2 µm. Finalmente, las muestras se secaron usando un concentrador de vacío eppendorf modelo 5301.

## 2) Análisis por HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS.

La separación de las muestras mediante digestión de tripsina y el análisis de las mismas se realizaron mediante el sistema HPLC/MS que consiste en un *HPLC Agilent 1290 Infinity II Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.)* equipado con un módulo de muestreo múltiple automatizado y una bomba binaria de alta velocidad, conectado a un espectrómetro de masas *Agilent 6550 Q-TOF (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.)* a través de una interfaz *Agilent Jet Stream Dual electrospray (AJS-Dual ESI)*. Los parámetros experimentales para HPLC y Q-TOF se insertaron en el software *MassHunter Workstation Data Acquisition (Agilent Technologies, Rev. B.08.00)*.

Las muestras secas de la digestión con tripsina se resuspendieron en 20 µL de tampón A, que consiste en agua/acetonitrilo/ácido fórmico (94,9:5:0,1), luego se inyectaron en una columna de HPLC de mapeo de péptidos *Agilent Advance Bio (2,7 µm, 150 x 1,0 mm, Agilent Technologies)*, termostaticada a 55°C, a una velocidad de flujo de 0,05 mL/min. Después de la inyección, la columna se lavó con tampón A durante 5 min para la extracción de los péptidos digeridos, usando un gradiente lineal 0-40% de tampón B (agua/acetonitrilo/ácido fórmico, 10:89,9:0,1) durante 90 min, seguidos por un gradiente lineal 40-95% de tampón B durante 20 min. Vale la pena mencionar que antes de cada inyección, primero se equilibró la columna durante 10 min.

En lo que respecta al espectrómetro de masas, este se utilizó en modo positivo. La presión del gas del nebulizador (nitrógeno) se ajustó a 35 PSI, mientras que el flujo del gas seco se ajustó a 14 L/min a una temperatura de 300°C, y el flujo del gas fijo se ajustó a 11 L/min a una temperatura de 250°C. Voltaje de los capilares de pulverización, boquilla, fragmentador y octopolo RF Vpp fueron 3500 V, 100 V, 360 V y 750 V respectivamente. Los datos del perfil se han obtenido tanto para MS como para

MS/MS en modo de rango dinámico extendido. El rango de masas de MS y MS/MS fue de 50-1700 m/z y las velocidades de escaneo fueron de 8 espectros/s para MS y 3 espectros/s para MS/MS. Se utilizó el modo Auto MS/MS, seleccionando precursores por abundancia y un máximo de 20 precursores por ciclo. Se utilizó una energía de colisión en rampa con una pendiente de 3,6 y un desplazamiento de -4,8. El mismo ion fue rechazado después de dos escaneos consecutivos.

El procesamiento y análisis de los datos se realizó en *Spectrum Mill MS Proteomics Workbench* (Rev B.06.00.201, *Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, EE. UU.).

Los datos en bruto fueron extraídos en condiciones predeterminadas de la siguiente manera: cisteínas no modificadas o cisteínas carbamidometiladas; [MH] + 50–10000 m/z; carga precursora máxima +5; mínima señal de ruido MS (S / N) 25; detención señales <sup>12</sup>C.

La búsqueda de MS/MS contra la base de datos de proteínas adecuada y actualizada se realizó con los siguientes criterios: modo de búsqueda de modificaciones variables (cisteínas carbamidometiladas, fosforilación de STY, metionina oxidada y conversión de glutamina N-terminal en ácido piroglutámico); digestión triptica con 5 divisiones máximas perdidas; instrumento *ESI-Q-TOF*; intensidad de pico mínimo seleccionada 50%; carga precursora máxima +5; masas monoisotópicas; tolerancia en masa del precursor peptídico 20 ppm; tolerancia de masa iónica del producto 50 ppm; y cálculo de puntuaciones (score) invertida de base de datos.

El programa Spectrum Mill otorga una puntuación (score) a cada péptido detectado, básicamente en función de la intensidad y precisión de la señal, así como un valor (SPI) que es el porcentaje de señales detectadas experimentalmente de cada fragmento respecto al número de señales teóricos que debería producir. Los criterios generales de confianza para la validación de péptidos fueron: puntuación (Score) >5; SPI >50.

ii) Medición de E2, P4, AMP cíclico, GMP cíclico presente en FF, FO y MC por análisis HPLC-MS/MS.

La medición de E2, P4, AMP cíclico y GMP cíclico presente en los biofluidos (FF, FO y MC) se realizó mediante análisis HPLC-MS/MS en el laboratorio de Proteómica de la Sección de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia. Para realizar la medición es necesario, en primer lugar, la digestión de la muestra con tripsina y posteriormente se realiza análisis por HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS.

#### 1) Análisis por HPLC-MS.

La separación y el análisis de las muestras se realizaron con un sistema HPLC/MS que consiste en un *HPLC Agilent 1290 Infinity II Series* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) equipado con un módulo de muestreo múltiple automatizado y una bomba binaria de alta velocidad, conectado a un espectrómetro de masas *Agilent 6550 Q-TOF* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) a través de una interfaz *Agilent Jet Stream Dual electrospray* (AJS-Dual ESI). Los parámetros experimentales para HPLC y Q-TOF se insertaron en el software *MassHunter Workstation Data Acquisition* (Agilent Technologies, Rev. B.08.00).

Los estándares o muestras (20  $\mu$ L) se termostataron a 4°C y se inyectaron en una columna de *HPLC Agilent Zorbax Eclipse Plus C18* (2,1x100 mm, 1,8  $\mu$ m), a un caudal de 0.4 mL/min. La columna se equilibró a 40°C. Los disolventes A [agua MilliQ + ácido fórmico al 0,1% (v/v)] y B [acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1% (v/v)] se usaron para la separación del compuesto. El programa de elución fue el siguiente:

Tiempo	0	2	9	10	11	15
% B	3	3	100	100	3	3

El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo positivo. La presión de gas del nebulizador se ajustó a 40 PSI, mientras que el flujo de gas seco se ajustó a 13 L/min a una temperatura de 250°C, y el flujo de gas fijo se ajustó a 12 L/min a una temperatura de 300°C. Voltajes de los capilares de pulverización, boquilla, fragmentador y octopolo RF Vpp fueron 3500 V, 100 V, 350 V y 750 V, respectivamente. Los datos de perfil en el rango de 50-500 m/z se obtuvieron para MS en modo de rango dinámico extendido de 2 GHz con 4 espectros/seg. La masa de referencia a 121,0509 se usó para la corrección de masa durante el análisis. El análisis de datos se realizó con el software *MassHunter Qualitative Analysis Navigator* (Agilent Technologies, Rev. B.08.00). Se analizaron los cromatogramas de iones extraídos de los siguientes compuestos: 273,1849 > 255,1749 m/z para  $\beta$ -estradiol, 315,2319 > 109,0660 para P4, 330,0566 > 136,0623 para AMPc y 346,0547 > 152,05686 para GMPc.

#### 5.2.4. Maduración *in vitro* de ovocitos.

Una vez que el contenido folicular se obtuvo, tal y como se describe en el apartado 5.2.2.1, se procedió a la separación bajo un estereomicroscopio (Nikon® SMZ-10a). Se seleccionaron aquellos ovocitos que presentaban varias capas de células de *cumulus oophorus* y un citoplasma homogéneo (Fig. 3 b). Posteriormente los ovocitos seleccionados se lavaron en el medio de maduración *in vitro* (MIV) *North Carolina State University-37* (NCSU 37) (Petters & Wells, 1993) sin hormonas. Finalmente, grupos de 50 complejos *cumulus*-ovocito (COC) se depositaron en el medio de maduración (500  $\mu$ L) suplementado con hormonas eCG/HCG y dbAMPc (Tabla 6.1) durante 22h a 38,5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación. Transcurrido este tiempo, los COCs se lavaron dos veces en un medio fresco NCSU 37 y se cultivaron sin hormonas ni dbAMPc durante 20h más en las mismas condiciones (Funahashi *et al.*, 1997).

#### 5.2.5. Fecundación *in vitro* y cultivo embrionario.

Tras 42h de MIV, los ovocitos maduros con el *cumulus* expandido (Fig. 3 c) se pipetearon para proceder a su separación de las células del *cumulus*. Grupos de 50 ovocitos decumulados (Fig. 3 d)

se lavaron dos veces en el medio de fecundación y fueron transferidos a placas de 4 pocillos que contenían 500  $\mu$ L de medio TALP suplementado (Tabla 5). Se procedió a la inseminación con los espermatozoides que habían migrado hacia los quimioatrayentes (FF, FO, MC, P4,  $\Sigma$ ). La concentración de fecundación fue de 1500 espermatozoides/mL. El tiempo de co-cultivo fue de 18h a 38,5°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido ese tiempo, parte de los presuntos cigotos se lavaron dos veces en PBS/PVA para eliminar el exceso de espermatozoides adheridos y se fijaron para su posterior evaluación. Los cigotos restantes se destinaron a cultivo embrionario.

Los cigotos destinados a cultivo embrionario se lavaron para eliminar el exceso de espermatozoides adheridos a la zona pelúcida así como de restos de medio de fecundación con medio de cultivo embrionario (Tabla 7 a). Durante las primeras 48h, grupos de 40 posibles cigotos se depositaron en 500  $\mu$ L de NCSU 23 A (Tabla 7 a) suplementado con lactato de sodio (5 mM), piruvato (0,5 mM) y 1% (v/v) fluido oviductal porcino de la fase lútea temprana del ciclo estral (NCSU 23 A). Transcurrido este tiempo, se evaluó la división embrionaria bajo estereomicroscopio y se transfirieron los embriones en estadio de 2 a 4 células a NCSU 23 B (Tabla 7 b) para el resto del período de cultivo (hasta 168h). Todo el proceso de cultivo se realizó a 38,5 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y 20% de O<sub>2</sub>. En el día 7 (168h post-inseminación), se evaluó bajo estereomicroscopio el desarrollo embrionario en el estadio de blastocisto (Fig. 11 a) donde se clasificaron como: blastocistos tempranos, blastocistos normales, blastocistos expandidos y blastocistos eclosionados.

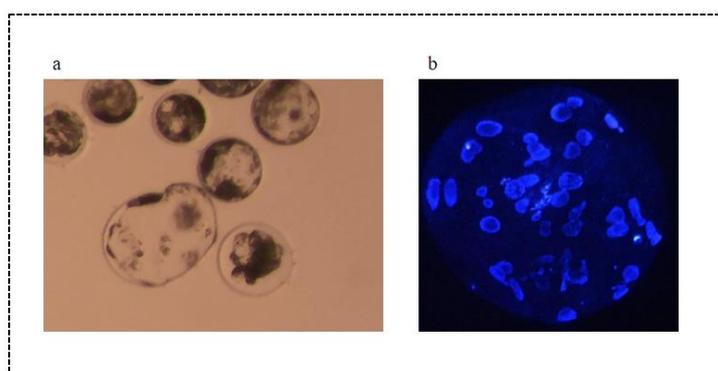


Figura 11. Imágenes de embriones. a) blastocistos sin teñir. b) embrión teñido con Hoechst para el conteo del número de células.

### 5.2.5.1. Fijación y evaluación de cigotos y embriones.

Para la fijación de los posibles cigotos se utilizó una solución de glutaraldehído al 0,5% (v/v) en PBS durante 30 min, seguidamente se lavaron en PBS/PVA y se tiñeron con Hoechst 33342 al 1% (p/v) protegido de la luz durante 10 min. Después, se lavaron en PBS/PVA y se transfirieron en portaobjetos con solución de montaje (Tabla 4). Finalmente, se depositó el cubreobjetos y se selló con laca de uñas hasta el momento de la evaluación la cual se realizó bajo microscopía de epifluorescencia a 40X (Fig. 12).

Los parámetros de FIV evaluados fueron: porcentaje de ovocitos penetrados, número medio de espermatozoide por ovocito, porcentaje de monospermia y eficiencia (entendiendo esta como el porcentaje de ovocitos monospermicos respecto al total de ovocitos evaluados).

Los parámetros evaluados para el caso del cultivo embrionario fueron el porcentaje de divididos a las 48h, como el número de blastocistos y blastocistos expandidos a las 168h, así como el número de células presentes en estos (Fig. 11 b).

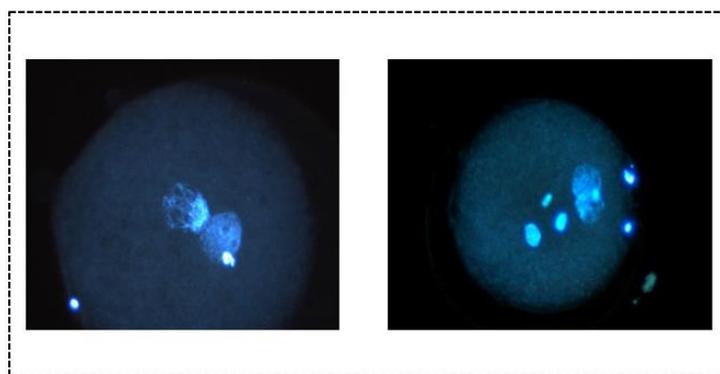


Figura 12. Imagen de cigotos tras 18h de fecundación teñidos con Hoechst y evaluados mediante microscopía de fluorescencia. En el cigoto de la izquierda se aprecian dos pronúcleos y dos corpúsculos polares. En la imagen de la derecha se observa un ovocito polispermico con dos pronúcleos, tres cabezas espermáticas en distintos grados de descondensación y dos corpúsculos polares.

### 5.3. Análisis estadístico.

Se hizo uso del programa Excel 2007 para la gestión de los datos y del programa SAS (SAS University197 Edition, SAS, 2016) para realizar el análisis estadístico propiamente dicho. Los datos

de los resultados se expresaron como media  $\pm$  SEM. Todos los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativa para  $p < 0,05$ .

#### 5.4. Diseño experimental.

Este trabajo fue diseñado para estudiar la capacidad quimiotáctica de los biofluidos (FF, FO, MC) sobre espermatozoides porcinos, así como el impacto sobre la calidad de los embriones obtenidos con espermatozoides seleccionados por FF durante la quimiotaxis.

El sistema de trabajo en todos los experimentos para determinar la actividad quimiotáctica fue el siguiente:

Espermatozoides lavados en un gradiente de Percoll ( $20 \times 10^6$  células/mL) fueron depositados en el pocillo A. En el pocillo B se colocó el quimioatrayente. Seguidamente la placa se introdujo en el incubador donde las condiciones ambientales fueron 5% de CO<sub>2</sub>, 38,5°C de temperatura y humedad a saturación. Transcurridos 20 min, se procedió a la obtención del medio del pocillo B y se determinó el número de espermatozoides que había migrado. Para determinar la concentración espermática se utilizó la cámara de recuento celular Neubauer y el cálculo se realizó tomando como control los espermatozoides migrados en el pocillo B sin quimioatrayente.

#### Experimento 1. Determinación de la actividad quimiotáctica del FF, FO, MC y P4.

Se ha determinado que los biofluidos como FF y FO poseen actividad quimiotáctica en varias especies y que esta actividad es dependiente de su concentración. Sin embargo, en la bibliografía revisada no se ha encontrado cual es el mejor atrayente para espermatozoides porcinos ni su concentración óptima. Los tipos de biofluidos que se seleccionaron para este experimento fueron elegidos por su participación en el proceso de fecundación, así como por su posible actividad quimiotáctica. Un esquema del desarrollo de este experimento viene reflejado en la figura 13.

- *Establecimiento de la curva de concentración para los diferentes biofluidos.*

En estudios previos realizados por Soriano-Úbeda *et al.* (2017) observaron que el rendimiento de la FIV utilizando 1% (v/v) de FF, 1% (v/v) de FO y 2% (v/v) de MC se veía mejorado. Por ello, se tomaron estos valores de referencia para la elaboración de las curvas de concentración. Además, como quimioatrayente control se empleó P4 de uso comercial, ya que ha sido descrito que tiene la capacidad quimiotáctica (desde 1 hasta 100 pM) en la especie humana (Teves *et al.*, 2006).

Las concentraciones empleadas (v/v) para establecer la curva de concentración con los diferentes biofluidos fueron:

FF: 0,13%, 0,25%, 0,5%, 1% y 1,5%; FO: 0,13%, 0,25%, 0,5%, 1% y 1,5%; y MC: 0,033%, 0,065%, 0,13%, 0,25% y 0,5%. Las concentraciones de P4 fueron: 1, 2,5, 5, 7,5 y 10 pM. En un ensayo previo (datos no mostrados) se determinó que valores superiores a los descritos no incrementaban la migración espermática.

El número de replicados utilizados en esta experiencia fue de 4.

- *Determinación del biofluido que presenta el mayor efecto quimiotáctico utilizando la concentración con mayor actividad quimioatrayente obtenida en la experiencia anterior.*

En la segunda experiencia se estudió el efecto quimiotáctico de los biofluidos utilizando las concentraciones que mayor proporción de migración espermática obtenida en la experiencia anterior cuando se estableció la curva de concentración. Además, se incluyó un grupo  $\Sigma$  compuesto por la suma de los tres biofluidos (FF + FO + MC) para comprobar si había o no algún efecto sinérgico entre estos compuestos.

De forma que los quimioatrayentes y su concentración fue la siguiente: FF: 0,25%, FO: 0,25%, MC: 0,13%, P4: 10 pM y  $\Sigma$ : 0,25%.

El número de replicados utilizados en esta experiencia fue de 5.

- *Efecto de la inhibición del calcio sobre el proceso quimiotáctico.*

En la tercera experiencia se estudió el efecto del inhibidor de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (NNC) sobre el porcentaje de la población espermática que migra hacia el quimioatrayente. Para ello los espermatozoides incubados o no con el inhibidor se colocaron en el dispositivo quimiotáctico. Pasado el tiempo de incubación, se analizó la migración de los espermatozoides hacia el quimioatrayente. El porcentaje de células migradas se calculó en relación al grupo del mismo quimioatrayente que no estuvo con el inhibidor. Los quimioatrayentes utilizados y sus concentraciones fueron FF: 0,25%, FO: 0,25%, MC: 0,13%, P4: 10 pM y  $\Sigma$ : 0,25%.

El número de replicados utilizados en esta experiencia fue de 4.

- *Determinación de las proteínas y E2, P4, AMP cíclico y GMP cíclico presentes en los biofluidos.*

Entre los componentes presentes en los biofluidos FF, FO y MC, se encuentran varias proteínas y E2, P4, AMP cíclico y GMP cíclico. Por ello, para tratar de determinar si la migración espermática podía estar influida por alguna de estas sustancias, se procedió a realizar sus mediciones mediante HPLC-MS/MS.

El número de replicados utilizados en esta experiencia fue de 2 por cada biofluido.

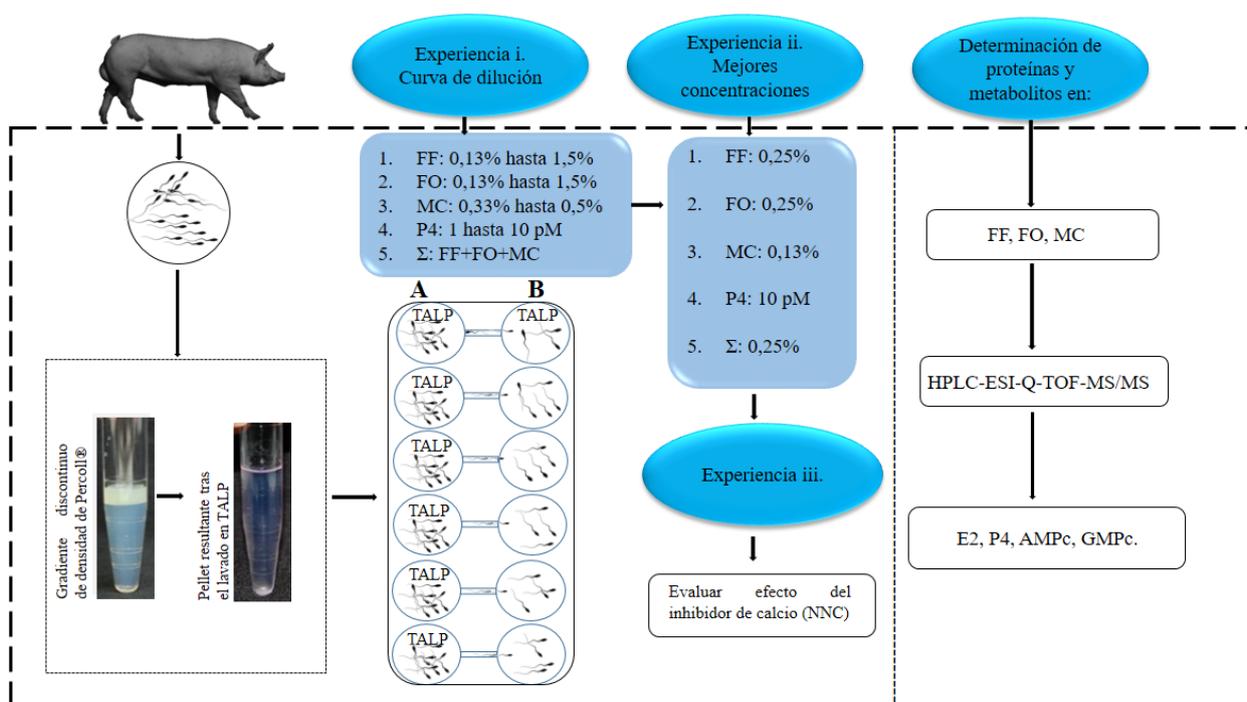


Figura 13. Esquema representativo del experimento 1. La muestra espermática se lavó en un gradiente de densidad Percoll®. En la primera experiencia se estableció la curva de concentración de los quimioatrayentes (experiencia i). Posteriormente, en la segunda experiencia se hizo un estudio comparativo de las mejores concentraciones de los quimioatrayentes. En la tercera experiencia, se utilizaron las mejores concentraciones de los quimioatrayentes (experiencia ii) para seleccionar y evaluar los espermatozoides previamente incubado con el inhibidor de calcio (NNC). Además, en el experimento 1 se determinaron proteínas y metabolitos presentes en los biofluidos relacionados con la quimiotaxis.

Experimento 2. Características morfológicas y funcionales de los espermatozoides que migraron hacia el quimioatrayente.

Los parámetros para evaluar la calidad de los espermatozoides que migraron hacia los quimioatrayentes FF: 0,25%, FO: 0,25%, MC: 0,13%, P4: 10 pM y  $\Sigma$ : 0,25% fueron: integridad acrosomal, motilidad, test hiposmótico y localización de la fosforilación de tirosina. Mientras se evaluó la fragmentación del ADN de espermatozoides solo tras el efecto quimiotáctico de FF: 0,25%. Además, tras la selección espermática con el uso de FF: 0,25%, FO: 0,25%, MC: 0,13%, P4: 10 pM y  $\Sigma$ : 0,25%, se decidió realizar el estudio sobre fecundación *in vitro* para evaluar el estado funcional de los espermatozoides que respondieron a los quimioatrayentes. Un esquema del desarrollo de este experimento viene reflejado en la figura 14.

El número de replicados utilizados en esta experiencia fue de 4.

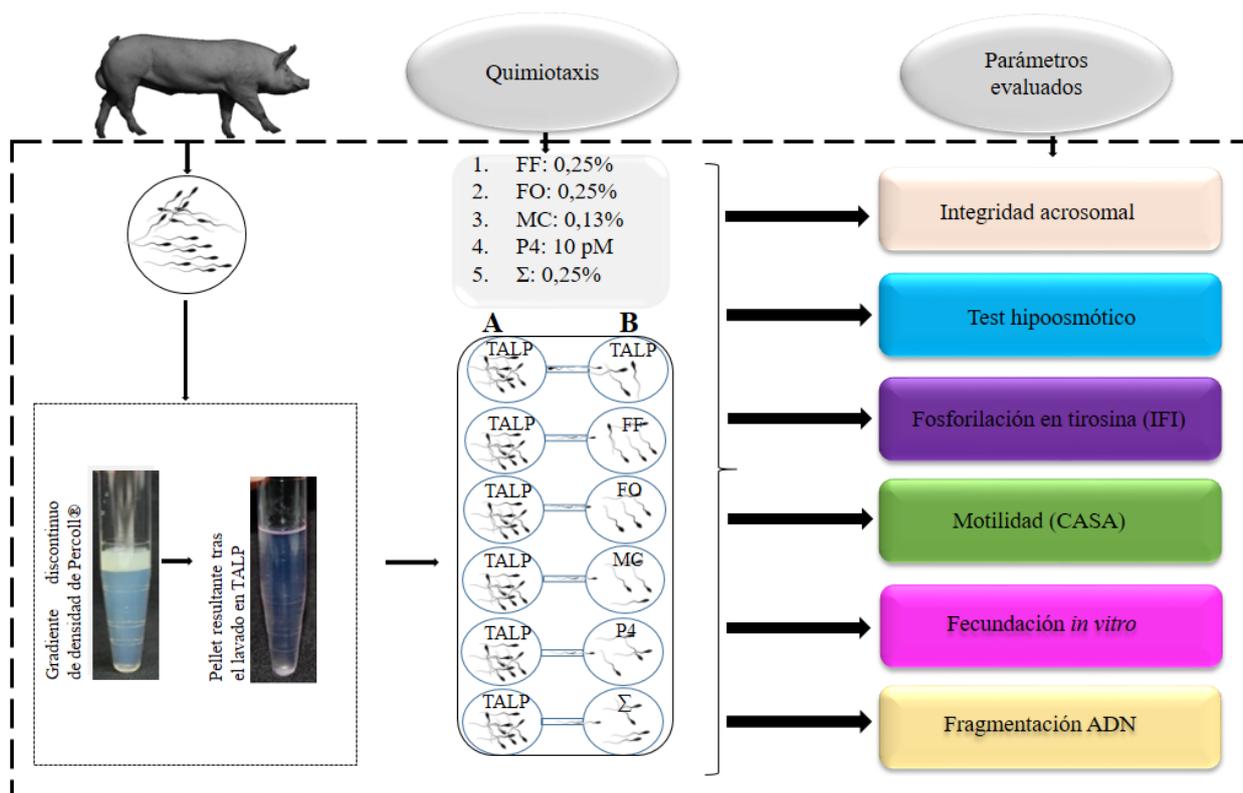


Figura 14. Esquema representativo del experimento 2. Tras el lavado de la muestra espermática en un gradiente de densidad Percoll®, se seleccionaron los espermatozoides mediante quimiotaxis. Posteriormente, se evaluaron los parámetros: integridad acrosomal, motilidad, test hiposmótico, localización de la fosforilación de tirosina, FIV y fragmentación de ADN.

Experimento 3. Efecto de la selección espermática por el fluido folicular sobre la calidad embrionaria.

La selección espermática con el uso del FF utilizado al 0,25% mostró los mejores resultados. Por ello, se decidió realizar el estudio sobre la calidad embrionaria. A las 18h post-inseminación, parte de los posibles cigotos se destinaron como control de FIV. El resto se llevó a cultivo embrionario evaluando el porcentaje de división a las 48h y la calidad de los blastocistos a los 7 días atendiendo al número de células. Un esquema del desarrollo de este experimento viene reflejado en la figura 15.

El número de replicados utilizados en esta experiencia fue de 6.





**RESULTADOS**



## 6. RESULTADOS

### 6.1. Experimento 1. Determinación de la actividad quimiotáctica del FF, FO, MC y progesterona.

Los espermatozoides capacitados no llegan al ovocito por azar, sino que son atraídos por las secreciones producidas en el tracto genital femenino. Entre las sustancias que posiblemente atraen a los espermatozoides se encuentran el FF, el FO, el MC y un componente común en todos ellos, la P4. Se han realizado numerosos estudios en mamíferos relacionado a quimiotaxis, principalmente en la especie humana. Sin embargo, para el caso de la especie porcina apenas existen datos. Por ello, y dada la problemática actual con las TRA en esta especie, nos planteamos determinar la actividad quimiotáctica de los biofluidos en la especie porcina.

- *Determinación de la concentración de los biofluidos con mayor potencial quimioatrayente.*

Cuando una determinada concentración de quimioatrayente satura su receptor afín, la célula no puede detectar aumento adicional en la concentración de quimioatrayente y, como resultado, la respuesta quimiotáctica disminuye. Por ello, en esta experiencia se investigó la concentración de los fluidos reproductivos que mayor cantidad de espermatozoides atraía.

De las concentraciones analizadas en la curva de dilución, las concentraciones 0,25% de FF, 0,25% de FO, 0,065%, 0,13% de MC y 10 pM de P4, fueron las que seleccionaron un mayor porcentaje de espermatozoides ( $p < 0,05$ ) (Fig. 16 A, B, C y D).

Por otro lado, observamos que a mayor concentración de biofluidos se producía un descenso del número de espermatozoides seleccionados en el pocillo B y esto ocurrió en todos los biofluidos estudiados. Para el caso de P4, en un estudio previo, se determinó que concentraciones mayores de 10 pM no incrementaban el número de espermatozoides que respondían a esta sustancia (datos no mostrados).

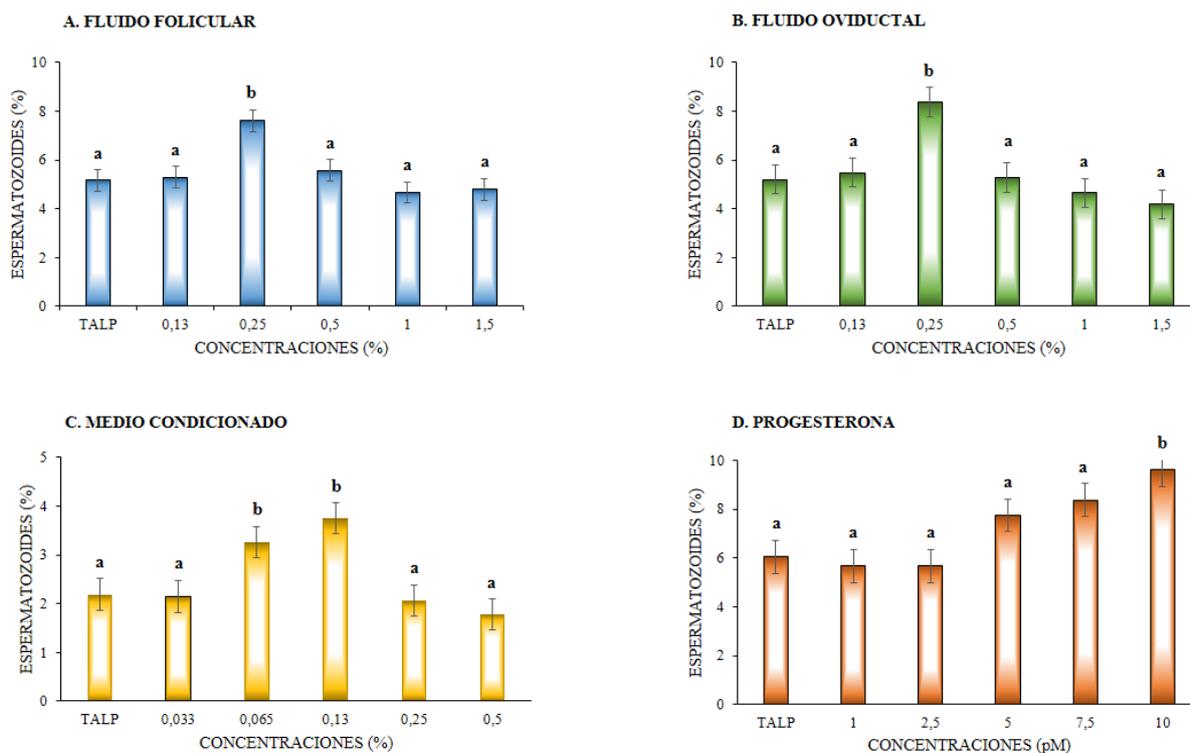


Figura 16. Porcentaje de espermatozoides obtenidos en el pocillo B después de 20 min de incubación con diferentes concentraciones de los quimioatrayentes: A) fluido folicular, B) fluido oviductal, C) medio condicionado y D) progesterona. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM (%). Los subíndices (*a*, *b*) en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

- *Determinación del biofluido que proporciona el mayor porcentaje de espermatozoides seleccionados.*

Esta experiencia se planteó para determinar qué biofluido proporcionaba mayor efecto quimiotáctico. Para ello se utilizaron las concentraciones a las que cada biofluido proporcionaba la mayor actividad quimiotáctica determinada en la experiencia anterior. Además, debido a la posibilidad de que se pudieran potenciar los biofluidos si todos estuvieran presentes en un mismo pocillo, se incluyó un grupo compuesto por el sumatorio de todos los biofluidos ( $\Sigma$ ).

Tras determinar la concentración en el pocillo B, se observó que no había diferencias en el porcentaje de espermatozoides entre los quimioatrayentes utilizados ( $p > 0,05$ ), aunque sí en relación al control ( $p < 0,05$ ). Tampoco se observó un incremento de espermatozoides seleccionados cuando todos los biofluidos estaban presentes como quimioatrayentes. Este resultado sugiere que los biofluidos tienen

capacidad quimiotáctica respecto al control, pero bajo estas condiciones, no apreciamos que ninguno de ellos fuese más eficaz que otro (Fig. 17). Además, el hecho de que todos los biofluidos estuvieran juntos no tuvo impacto en el incremento del porcentaje de espermatozoides seleccionados.

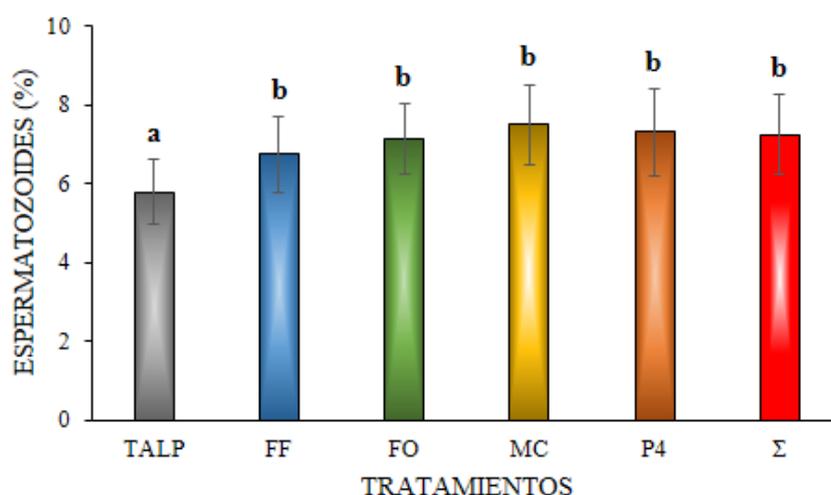


Figura 17. Porcentaje de espermatozoides obtenidos en el pocillo B después de 20 min de incubación con los diferentes quimioatrayentes. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM (%). Los subíndices (*a*, *b*) en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

- *Efecto de la inhibición del calcio sobre el proceso quimiotáctico.*

El fenómeno de la quimiotaxis se encuentra estrechamente relacionado con la activación de los canales CatSper y el incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular que se produce cuando estos canales se activan. El compuesto NNC 55-0396 bloquea los canales CatSper reprimiendo la entrada de  $Ca^{2+}$ . Por ello, esta experiencia se realizó para determinar si el efecto quimiotáctico de estos biofluidos se veía mermado al inhibir los canales de  $Ca^{2+}$ .

Los resultados mostraron (Tabla 9) que al incubar los espermatozoides con el inhibidor (NNC-FF, NNC-FO, NNC-MC, NNC-P4, NNC- $\Sigma$ ) disminuían su capacidad de migrar hacia el quimioatrayente respecto de los no incubados ( $p < 0,05$ ). Para el caso del grupo control, observamos que se produjo la misma situación, es decir se redujo el número de espermatozoides en el pocillo B.

Tabla 9. Efecto del inhibidor de  $\text{Ca}^{2+}$  en espermatozoides porcino. Comparación entre el grupo no incubado con el inhibidor (NNC) y el grupo incubado con el inhibidor. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM (%). Los subíndices (*a*, *b*, *c*) en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

TRATAMIENTOS	%SPZ
TALP	7,5 $\pm$ 1,0 <sub>b</sub>
NNC-TALP	5,6 $\pm$ 1,0 <sub>c</sub>
FF	9,1 $\pm$ 1,0 <sub>a</sub>
NNC-FF	6,8 $\pm$ 1,0 <sub>b</sub>
FO	9,2 $\pm$ 1,0 <sub>a</sub>
NNC-FO	6,8 $\pm$ 1,0 <sub>b</sub>
MC	9,1 $\pm$ 2,0 <sub>a</sub>
NNC-MC	6,8 $\pm$ 1,0 <sub>b</sub>
P4	10,3 $\pm$ 2,0 <sub>a</sub>
NNC-P4	7,4 $\pm$ 1,0 <sub>b</sub>
$\Sigma$	9,3 $\pm$ 1,0 <sub>a</sub>
NNC- $\Sigma$	6,9 $\pm$ 1,0 <sub>b</sub>

- *Análisis de las proteínas y metabolitos en los biofluidos mediante HPLC-MS.*

Aunque algunos de los quimioatrayentes espermáticos en mamíferos como la P4 han sido reconocidos, aún quedan muchos por identificar. En esta experiencia hemos cuantificado la P4 y otros posibles quimioatrayentes, así como la composición en proteínas relacionadas con el proceso de la quimiotaxis en los biofluidos.

1. *Determinación de las concentraciones de  $\beta$ -estradiol (E2), progesterona (P4), AMP cíclico y GMP cíclico en los biofluidos.*

Las concentraciones halladas en los biofluidos de E2, P4, AMPc y GMPc vienen reflejadas en la Tabla 10. El FF presenta la mayor cantidad de E2, P4 y GMPc, seguido del FO, aunque este presenta la mayor cantidad de AMPc. Por otro lado, los valores más bajos se observaron en el MC, a excepción de E2 y P4 que es más elevada que en el FO.

Tabla 10. Concentración de  $\beta$ -estradiol, Progesterona, AMPc y GMPc en FF, FO y MC en el pocillo B.

ng/mL	FF	FO	MC
$\beta$ -estradiol	0,71	0,00011	0,104
Progesterona	0,53	0,050	0,08
AMPc	0,11	0,28	0,047
GMPc	2,1	0,39	0,099

## 2. Proteínas relacionadas con la quimiotaxis identificadas por HPLC-MS/MS en FF, FO y MC.

Las Tablas 11, 12 y 13 muestran las proteínas relacionadas con la quimiotaxis en la especie porcina identificadas en nuestro estudio. Cuando analizamos los perfiles de las proteínas presentes en los biofluidos se aprecian composiciones parecidas entre ellos, aunque con diferentes cantidades de proteínas. En el FF (Tabla 11) se identificaron dos proteínas diferentes con actividad, tres GC y una guanilina. También se identificaron una isoforma de GC, dos de AC y una de PNA. Sin embargo, ninguna de las isoformas identificadas tenía actividad. Igualmente, en el FO (Tabla 12) además de identificar dos proteínas diferentes (tres GC y dos AC con actividad), también se identificaron dos isoformas de GC, cinco de PNA y siete isoformas de AC sin actividad. Finalmente, en el MC (Tabla 13) se observaron la presencia de dos proteínas; un GC y un AC, ambas con actividad. Además, se identificaron proteínas sin actividad, entre ellas dos isoformas de GC, cuatro AC y tres PNA.

De manera más específica, se analizaron si existían proteínas en común entre los biofluidos mediante el diagrama de Venn (Fig. 18). El diagrama muestra un total de seis proteínas de interés en el FF de las cuales cuatro son únicas del FF, una proteína (*Guanylate cyclase soluble subunit alpha-1 isoform A*) en común con el FO y otra con el FO y MC (GC). Mientras que en el FO se identificaron 16 proteínas de interés, de las cuales tiene cinco (*Atrial natriuretic peptide-converting enzyme isoform 1*, *Guanylate cyclase soluble subunit beta-1 isoform 2-like (Fragment)*, *Adenylate cyclase*, *Adenylate cyclase type 2*, *Atrial natriuretic peptide receptor 1*) en común con el MC, y una (GC) con el FF y MC. Por último, en el MC se identificaron 11 proteínas de interés entre ellas, tiene cinco en común con el FO, una en común con el FO y el FF (GC). Es decir, el GC es la única proteína en común que se observó entre los tres biofluidos.

Tabla 11. Proteínas identificadas en el FF de la especie porcina relacionadas con la quimiotaxis por la técnica HPCL-ESI-Q-TOF-MS/MS.

Tto	Nº de Acceso (UniProtKB)	Proteínas	Genes	Peso molecular (kD)	Nº de peptides	% cobertura	Funciones biológicas	Secuencia
FF	A0A287B5N6	Guanylate cyclase	1_PLBD1	113.5	2	7	Intracellular signal transduction	ISVLYDIAKGmSYLHSSKTEVHGRLKSTNCVVDSR
FF	A0A480DPW8	Atrial natriuretic peptide receptor 3 isoform 1 (Fragment)	2_N/A	66.9	1	7.3	n/a	TRIVEHTNSSPCKASGGLEESA VTGIVVGALLGAGLLmAFY FFR
FF	A0A480DZL5	Guanylate cyclase soluble subunit alpha- 1 isoform A	3_N/A	78	1	5.4	n/a	LEDFTGRGLYLSDIPHNALRDV VLIGEQARAQDGLKK
FF	A0A287BS99	Guanylate cyclase	4_LOC10052 3457	109.4	1	3	Intracellular signal transduction	STVQTL SAWMKAIKLTFEGKGF EETYWLVGK
FF	A0A480S6A4	Adenylate cyclase type 5 isoform 1	5_N/A	70.4	1	6.3	n/a	LHSQRENQQERLLLSVLPRHV AmEMKADINAKQEDMMF HK
FF	A0A480EU95	Adenylate cyclase type 10-like	6_N/A	40.4	1	9.3	n/a	LGFQAHEIcRHLKKPALENL VLSVLF RSAFLKK
FF	P79897	Guanylin	7_GUCA2A	11.9	1	33.9	Guanylate cyclase activator activity	mNTFLFPTLCLLGVWAALAGG VTVKDG EFSFSLESVKK
FF	A0A287B4X9	Guanylate cyclase	8_NPR2	114.4	1	3.2	Intracellular signal transduction	LVEERtQAyLEEKRKAEALLY QILPHSVAEQLK
FF	A0A287B8Q2	Guanylate cyclase	9_N/A	105.1	1	3.7	n/a	IGDPTASGPLRP sLSEAVGNAK VCPEKRPAFSSIK

Tabla 12. Proteínas identificadas en el FO de la especie porcina relacionadas con la quimiotaxis por la técnica HPCL-ESI-Q-TOF-MS/MS.

Tto	N° de Acceso (UniProtKB)	Proteínas	Genes	Peso molecular (kD)	N° de peptides	% cobertura	Funciones biológicas	Secuencia
FO	A0A287AU99	Guanylate cyclase	1_GUCY2F	122.3	4	12.7	Detection of light stimulus involved in visual perception; intracellular signal transduction	GSRASVSVQITSEVQSGRSPRLSFSSGSLTLV TYK
FO	A0A480PHJ1	Atrial natriuretic peptide receptor 1	2_N/A	97.2	3	12.3	n/a	LRIGVHTGPVcAGVVGLKmpRYcLFGDTVN TASRMESNGQALK
FO	A0A480TBE2	Atrial natriuretic peptide receptor 2 isoform X3	3_N/A	114.8	3	10.3	n/a	LRIGVHTGPVcAGVVGLKmpRYcLFGDTVN TASRMESNGQALK
FO	A0A286ZWC5	Adenylate cyclase	4_ADCY4	119.7	2	7.6	cAMP biosynthetic process; intracellular signal transduction	IKTIGSTYmAAATGLNATSGQDTQQDAERSC SHLGTMVEFAVALGsK
FO	A0A480T841	Adenylate cyclase type 6 isoform X1	5_N/A	97.5	2	6.2	n/a	IQVTTDLYQVLAAGYQLEcRGVVKVKGK
FO	A0A287ADN6	Adenylate cyclase type 9	6_ADCY9	150.2	2	3.3	Cyclic nucleotide biosynthetic process; intracellular signal transduction	LSNSHTSLcEILQEK
FO	A0A480EYL4	Adenylate cyclase type 10 isoform X6	7_N/A	112.5	1	3	n/a	LVSISVTNGPVFcGMVGAVARHEYtVIGPK
FO	A0A480L319	Guanylate cyclase soluble subunit beta-1 isoform 2-like (Fragment)	8_N/A	26.4	2	20.9	n/a	LRGQMIWMESTRCMVYLCsPK

*Resultados*

F0	A0A480EIM7	Adenylate cyclase type 2	9_N/A	153.8	1	2.9	n/a	IKILGDCYYCVSGLPISLPNHAKNCVKMGL DmcEAIKKVR
F0	I3LJL1	Guanylate cyclase	10_GUCY2 D	120.4	1	2.2	cGMP biosynthetic process; receptor guanylyl cyclase signaling pathway; signal transduction	IHVNMSTVRILcALDQGFQTEVRGR
F0	A0A0B8RW44	Adenylate cyclase	11_ADCY7	120.6	1	2.5	cAMP biosynthetic process; intracellular signal transduction	LAIERLKERGDRRyLPDNNFHSLyVK
F0	A0A480K9E3	Atrial natriuretic peptide receptor 3 isoform 2	12_N/A	48.6	1	7.5	n/a	IIQQTWNRTFEGAGTQEVLGRDPcPKPPLcLL R
F0	A0A287B5N6	Guanylate cyclase	13_PLBD1	113.5	1	3.1	Intracellular signal transduction	NESYMDtLIRRLQLYSRNLEHLVEERTQLYK
F0	A0A480CMW7	Adenylate cyclasetype 1	14_N/A	26.4	1	18.6	n/a	MMGRcRQPPSPGVPCPSRSCGSEQLIFRRVA VPKpmAVTYGESTfK
F0	A0A480RYC7	Atrial natriuretic peptide-converting enzyme isoform 1	15_N/A	103.7	1	4.2	n/a	LVKSILHPRYSRTVVDYDISIVELsEDINETS XXXMSGR
F0	A0A480K4H3	Atrial natriuretic peptide receptor 3 isoform X5-like (Fragment)	16_N/A	14.6	1	23.6	n/a	IVEHTNSsPCKASGGLRRISSDRNCcGGLTR
F0	A0A481A1V2	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor isoform X1 (Fragment)	17_N/A	45.8	1	8.2	n/a	LARSTLLSLFcSAHNSFLVFSISRTNLsPEVPK

FO	A0A480EU95	Adenylatecyclasetype 10-like	18_N/A	40.4	1	7	n/a	EFFSRcVTCPVYHQRVSELKASVmR
FO	A0A480DZL5	Guanylate cyclase soluble subunit alpha-1 isoform A	19_N/A	77,9508	1	4.6	n/a	IGLHsGSVFAGVVGVKmPRYcLFGNNVTLA NK

---

Tabla 13. Proteínas identificadas en el MC de la especie porcina relacionadas con la quimiotaxis por la técnica HPCL-ESI-Q-TOF-MS/MS.

Tto	Nº de Acceso (UniProtKB)	Proteínas	Genes	Peso molecular (kD)	Nº de peptides	% cobertura	Funciones biológicas	Secuencia
MC	A0A480JDM3	Adenylate cyclase type 2	1_N/A	80.2	2	7.2	n/a	qHLVKTYFVINPKGER
MC	A0A480EJD9	Atrial natriuretic peptide receptor 1	2_N/A	147.5	2	5.6	n/a	mPRYcLFGDTVNTASRmESNGEALKIHLSSETR
MC	A0A480EYL4	Adenylate cyclasetype 10 isoform X6	3_N/A	112.5	2	5.7	n/a	LVSISVTNGPVFcGmVGAVARHEYTIVIGPK
MC	A0A287BS99	Guanylate cyclase	4_LOC10052 3457	109.4	1	3.5	Intracellular signal transduction	IHVSRSTVQTLsAWMKAIKLTfEGKGFEETYWLVGK
MC	A0A287AQR6	Adenylate cyclase	5_ADCY8	128.9	1	2.7	cAMP biosynthetic process; intracellular signal transduction	LESGGIPGRIHISKATLDCLNGDYSVEEGHGK
MC	A0A480LJQ7	Guanylate cyclase soluble subunit beta-1 isoform 2	6_N/A	73.4	1	4.3	n/a	KNTGtEVVASVtSLIVCSPLmHRLFPGK
MC	A0A287ADN6	Adenylate cyclasetype 9	7_ADCY9	150.2	1	2.3	Cyclic nucleotide biosynthetic process; intracellular signal transduction	ADHAYCCIEMLGMIRAIEQFCQEKKEMVNMR
MC	I3LJ94	Guanylate cyclase	8_PLBD1	122.4	1	4	cGMP biosynthetic process; intracellular signal transduction; receptor guanylyl cyclase signaling pathway; regulation of cell population proliferation; response to toxic substance; signal transduction	LPEASKTTRNTDVmPCELFVFTVFLTISEGHGGLLCN cVLDAY

MC	A0A480L319	Guanylate cyclase soluble subunit beta-1 isoform 2-like (Fragment)	9_N/A	26.4	1	9.3	n/a	LRGQMIWMESTRcMVYLCsPK
MC	A0A480EGJ2	Atrial natriuretic peptide-converting enzyme isoform 1	10_N/A	122.6	1	2.5	n/a	LNGTTLHKLLVEGQsCHSRSKISLLcAK
MC	A0A480DC24	Atrial natriuretic peptide receptor 1-like (Fragment)	11_N/A	15.3	1	24.1	n/a	LERcPLSFLWPRKPPNSESHPHVVcDHTGLSLR
MC	A0A480EN30	Adenylate cyclasetype 6	12_N/A	137.2	1	3.3	n/a	IYIQKHDNVsILFADIEGFtSLASQCTAQELVmTLNEL FAR

---

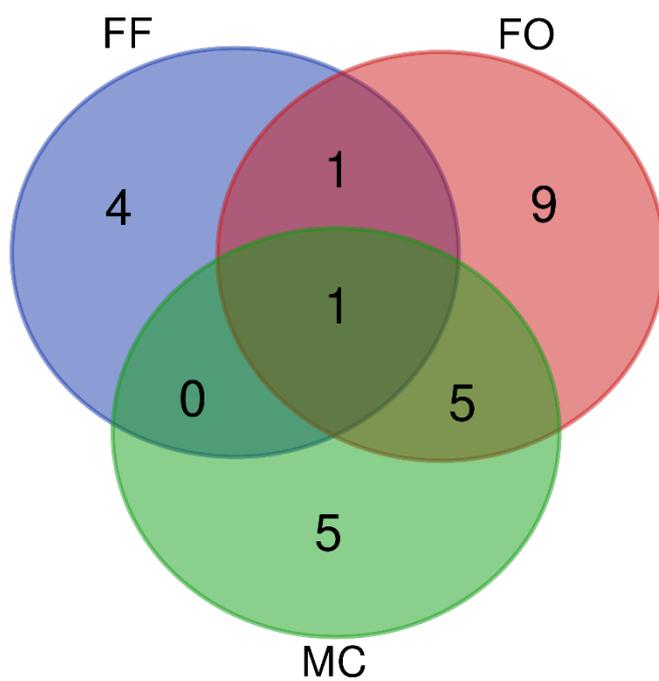


Figura 18. Representación mediante Diagrama de Venn de las proteínas identificadas en los biofluidos. El diagrama muestra la coincidencia de la proteína GC (1) en los tres biofluidos.

## 6.2. Experimento 2. Características morfológicas y funcionales de los espermatozoides que migraron hacia el quimioatrayente.

La activación de los espermatozoides, así como su comportamiento quimiotáctico hacia los ovocitos se encuentran regulados por el ambiente oviductal y por las secreciones secuenciales presentes en el oviducto. Por ello nos planteamos determinar los cambios morfológicos y funcionales en respuesta a los biofluidos reproductivos utilizados como quimioatrayentes.

- *Integridad de la membrana acrosomal evaluada mediante la lectina PNA.*

En la figura 19 queda representado el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma integro. Observamos que los valores más altos se presentaron en los grupos FF, FO y MC, aunque únicamente se observaron diferencias significativas entre el grupo FO y el grupo  $\Sigma$  ( $p < 0,05$ ).

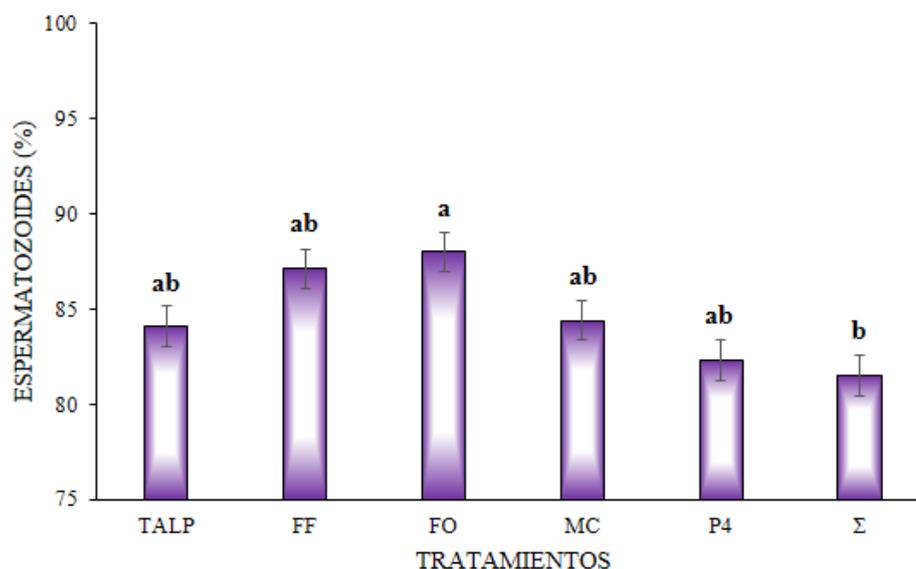


Figura 19. Espermatozoides con acrosoma integro evaluado mediante la lectina PNA-FITC tras la migración hacia los quimioatrayentes. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM (%). Los subíndices (*a*, *b*) en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

- *Parámetros cinéticos de los espermatozoides evaluados por CASA.*

Los resultados de motilidad de los espermatozoides tras la quimiotaxis vienen reflejados en la Tabla

14. No se observaron diferencias entre los grupos experimentales ni con el grupo control ( $p > 0,05$ ).

Tabla 14. Resultados obtenidos mediante el análisis computarizado de imágenes (CASA) de la motilidad de los espermatozoides que migraron hacia los diferentes quimioatrayentes.

PARAMÉTROS	TALP	FF	FO	MC	P4	Σ
Mot. Total (%)	47,0 ± 8,0	28,5 ± 3,2	41,7 ± 5,3	45,2 ± 7,6	37,5 ± 9,4	29,8 ± 4,2
Mot. Prog (%)	21,0 ± 7,2	12,0 ± 3,8	20,8 ± 4,8	23,5 ± 6,9	22,7 ± 0,4	12,3 ± 4,9
VCL (µm/s)	65,8 ± 8,1	42,0 ± 5,6	54,7 ± 3,7	52,3 ± 7,5	53,8 ± 9,9	51,7 ± 5,5
VSL (µm/s)	44,8 ± 8,7	29,8 ± 5,0	39,3 ± 4,8	34,3 ± 6,2	37,2 ± 8,9	35,7 ± 4,7
VAP (µm/s)	49,3 ± 8,0	32,8 ± 4,9	42,8 ± 4,3	39,2 ± 6,3	41,0 ± 9,0	38,7 ± 4,8
ALH (µm)	1,8 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,7 ± 0,3	1,5 ± 0,2
LIN (%)	65,7 ± 7,0	70,0 ± 3,6	70,5 ± 5,6	65,2 ± 3,7	66,3 ± 8,8	68,3 ± 3,9
STR (%)	87,5 ± 4,5	89,5 ± 2,0	90,2 ± 2,9	86,8 ± 2,5	87,8 ± 4,4	90,3 ± 2,2
WOB (%)	74,0 ± 4,3	77,5 ± 2,2	77,2 ± 3,8	74,5 ± 2,3	73,7 ± 6,9	75,0 ± 2,9
BCF (Hz)	6,3 ± 0,7	6,7 ± 0,7	7,0 ± 0,3	6,5 ± 0,4	7,0 ± 0,8	7,3 ± 0,3

Mot. Total: motilidad total. Mot. Prog: motilidad progresiva. VCL: velocidad curvilínea. VSL: velocidad rectilínea. VAP: velocidad media. LIN: índice de linealidad. STR: índice de rectitud. WOB: índice de oscilación. ALH: amplitud desplazamiento lateral de la cabeza. BCF: frecuencia de batido de la cabeza. Los valores se expresan como la media ± SEM (%).

- *Respuesta espermática a condiciones de hipoosmolaridad: Test hipoosmótico.*

Una de las características de una célula con membrana funcional, es la adaptación a las condiciones osmóticas que le rodea. Por tanto, nos planteamos evaluar la calidad espermática desde un punto de vista de la funcionalidad de su membrana sometiendo a los espermatozoides a condiciones hipoosmóticas. Las células que reaccionan positivamente a las condiciones hipoosmóticas muestran un cambio morfológico evidenciado por una curvatura de diferente grado en el flagelo espermático. Tras analizar los espermatozoides que mostraron respuesta a estas condiciones hipoosmóticas, observamos que los que habían migrado hacia los quimioatrayentes (FF, FO, MC, P4 y Σ) presentaban mayor porcentaje de respuesta (Fig. 20) respecto al grupo control (TALP) ( $p < 0,05$ ) pero sin diferencias entre los grupos experimentales.

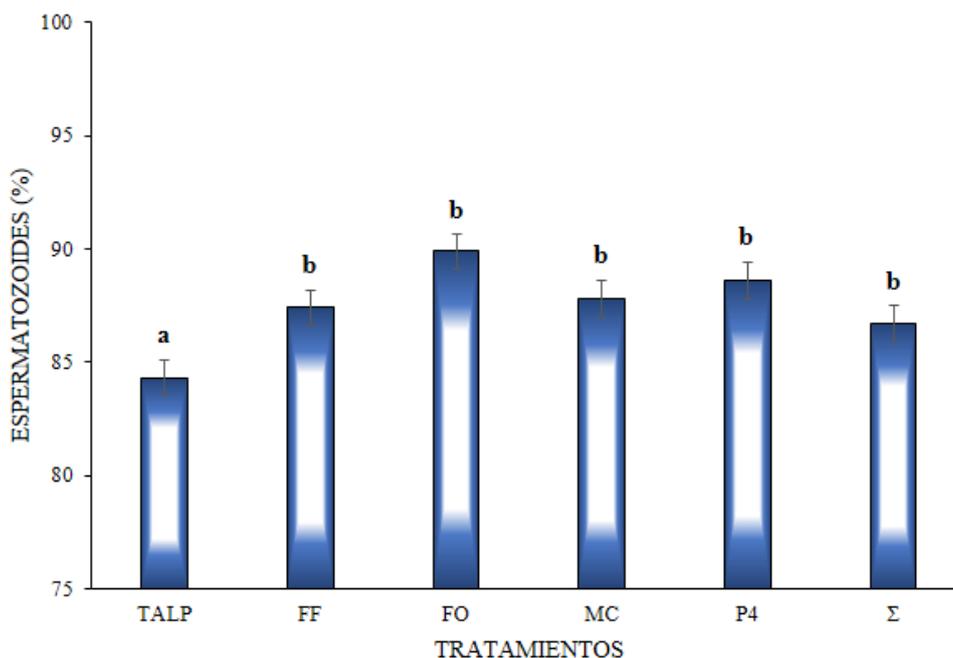


Figura 20. Evaluación del cambio morfológico en la cola del espermatozoide tras la incubación con la solución hipoosmótica. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM (%). Los subíndices (*a*, *b*) en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

- *Localización de la fosforilación de la tirosina.*

La fosforilación de proteínas participa en el control de la función espermática durante la fecundación, por ello y bajo la premisa de que la capacitación se encuentra regulada por los fluidos reproductivos de forma secuencial, se procedió a analizar la localización de la fosforilación de tirosina de los espermatozoides que habían migrado hacia los diferentes quimioatrayentes y que, finalmente, los espermatozoides estuvieron inmersos en ello.

Al evaluar los resultados de los patrones de fosforilación en los espermatozoides que habían respondido a los diferentes quimioatrayentes observamos que en todos los grupos experimentales se producía un incremento de fosforilación respecto de la muestra sin tratar, encontrándose los valores más altos para el patrón III, lo que demuestra que los espermatozoides que migraron hacia el quimioatrayente habían sido capacitados. Sin embargo, cuando observamos los patrones de fosforilación entre los grupos experimentales no apreciamos diferencias entre ellos (Tabla 15).

Tabla 15. Porcentaje de patrones de inmunoreactividad a fosfotirosina en los espermatozoides que migraron hacia los quimioatrayentes evaluados mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM (%). Los subíndices (*a*, *b*) en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

TRATAMIENTOS	PATRON I	PATRON II	PATRON III
TALP	18,3 $\pm$ 6,2a	12,9 $\pm$ 4,2	68,8 $\pm$ 6,4a
FF	16,0 $\pm$ 2,7a	8,9 $\pm$ 2,1	75,4 $\pm$ 1,9a
FO	16,3 $\pm$ 2,0a	7,8 $\pm$ 1,6	75,9 $\pm$ 2,2a
MC	19,5 $\pm$ 1,7a	8,1 $\pm$ 2,7	72,6 $\pm$ 2,5a
P4	19,5 $\pm$ 2,3a	10,4 $\pm$ 3,9	70,3 $\pm$ 2,9a
$\Sigma$	18,0 $\pm$ 1,6a	9,4 $\pm$ 2,9	72,6 $\pm$ 3,1a
Eyaculado sin tratar	66,0 $\pm$ 4,6b	18,9 $\pm$ 3,4	15,0 $\pm$ 4,4b

- *Efecto de la selección espermática por quimiotaxis sobre la fecundación in vitro.*

La fecundación *in vitro* es considerada como una herramienta de alta sensibilidad para la evaluación de la calidad seminal. Por tal motivo, planteamos su utilización para discernir si la selección espermática por los diferentes quimioatrayentes se veía mejorada por alguno de los biofluidos empleados.

La evaluación de los resultados de FIV se realizó a las 18h post-inseminación (Tabla 16). Observamos que el mayor número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida ocurrió en los grupos TALP y FF y los valores más bajos para los grupos FO y  $\Sigma$  ( $p < 0,05$ ). En cuanto al porcentaje de ovocitos penetrados, el FF fue el que presentó el mayor valor respecto del resto de grupos experimentales ( $p < 0,05$ ), siendo el grupo FO en el que se apreció la penetración más baja. No obstante, en cuanto al número de espermatozoides por ovocito penetrado no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 16. Parámetros de FIV obtenidos con espermatozoides seleccionados mediante quimiotaxis evaluados a las 18h post-inseminación.

TRATAMIENTOS	N	ZP BINDING	PEN (%)	ESPZ/OVO
TALP	126	9,2 ± 0,9a	41 ± 4,4a	2,3 ± 0,2
FF	139	9,0 ± 0,5a	66 ± 4,0b	2,2 ± 0,1
FO	121	2,6 ± 0,2cd	27 ± 4,1ac	1,7 ± 0,1
MC	95	5,3 ± 0,7b	39 ± 5,0a	1,9 ± 0,2
P4	107	4,8 ± 1,0bc	37 ± 4,7a	1,8 ± 0,1
Σ	114	1,2 ± 0,2d	13 ± 3,2c	1,7 ± 0,3

N: número de ovocitos evaluados, ZP binding: espermatozoides unidos a la zona pelúcida, PEN (%): porcentaje de ovocitos penetrados, ESPZ/OVO: número de espermatozoides por ovocito penetrado. Los valores se expresan como la media ± SEM (%). Los subíndices (*a, b, c, d*) en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

- *Evaluación de la fragmentación del ADN espermático.*

Tras analizar la calidad de los espermatozoides que migraron hacia el quimioatrayente, observamos que solo la FIV mostró una clara diferencia entre FF y el resto de quimioatrayentes. Esto nos indujo a plantearnos la evaluación del ADN de los espermatozoides que migraron hacia el FF y los espermatozoides que lo hicieron hacia el TALP.

Dado que la fragmentación del ADN en espermatozoide porcinos es muy baja, decidimos utilizar dos técnicas, (naranja de acridina y el kit Halomax®) para tratar de diferenciar con mayor exactitud entre los grupos experimentales. Tras realizar el recuento de los espermatozoides de cada muestra con los distintos tratamientos y con las dos técnicas, calculamos el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado (Tabla 17). Al comparar los resultados obtenidos en los distintos tratamientos se observó que los espermatozoides con ADN fragmentado eran casi nulos, tanto con la evaluación con naranja de acridina como con el kit Halomax® y no existían diferencias significativas entre ellos ( $p > 0,05$ ). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre las muestras estudiadas inmediatamente

después de la quimiotaxis y las muestras estudiadas tras 24h de incubación a 38,5°C y 5% CO<sub>2</sub> ( $p > 0,05$ ).

Tabla 17. Porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado evaluado con el ensayo de Naranja de Acridina y el kit comercial Halomax® a las 0 y 24h tras la quimiotaxis.

TRATAMIENTOS	NARANJA DE ACRIDINA		HALOMAX®	
i	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,3	0,2 ± 0,2	0,0 ± 0,0
ii	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,5	0,5 ± 0,3	0,0 ± 0,0
iii	0,5 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,2	0,0 ± 0,0
iv	0,2 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
v	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
vi	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,2	0,5 ± 0,3	0,0 ± 0,5

Tratamientos: i) espermatozoides lavados en gradientes de Percoll® no migrados (pocillo A), ii) espermatozoides no lavados en gradientes de Percoll® no migrados (pocillo A), iii) espermatozoides lavados en gradientes de Percoll® migrados hacia TALP (pocillo B), iv) espermatozoides lavados en gradientes de Percoll® migrados hacia 0,25% de FF (pocillo B), v) espermatozoides no lavados en gradientes de Percoll® migrados hacia TALP (pocillo B), vi) espermatozoides no lavados en gradientes de Percoll® migrados hacia 0,25% de FF (pocillo B). Los valores se expresan como la media ± SEM (%) ( $p > 0,05$ ).

6.3. Experimento 3. Efecto de la selección espermática por el fluido folicular sobre la calidad embrionaria.

No todos los espermatozoides de un eyaculado son igualmente buenos para lograr una fecundación con éxito, independientemente de que la fecundación sea *in vivo* o *in vitro* (Holt & Fazeli, 2015). Por ello, debido a la heterogeneidad de la población espermática del eyaculado, la selección de espermatozoides antes de las TRA se ha considerado un paso importante para garantizar un resultado exitoso y una estrategia para mejorar la eficiencia de las TRA. Aunque todos los quimioatrayentes analizados en las experiencias previas mostraron buenas propiedades para la selección espermática, el FF fue el que mejores resultados de fecundación proporcionó. Además, el FF contiene una compleja

mezcla de proteínas, antioxidantes, metabolitos y otros factores que son transferidos al espermatozoide y podrían influir en el posterior desarrollo embrionario (Bahmanpour *et al.*, 2012).

Por ello, y con el fin de analizar la posible relación entre la selección espermática con el FF y la calidad embrionaria se analizó la producción de embriones desde la división embrionaria a las 48h hasta el estadio de blastocisto expandido a las 168h.

Tabla 18. Control del rendimiento de la FIV utilizando espermatozoides seleccionados con FF como quimioatrayente.

TRATAMIENTOS	N	PEN (%)	ESPZ/OVO	PNM	MONO (%)	REND
TALP	166	98,3 ± 1,2 <sup>a</sup>	1,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	57 ± 4,7	56 ± 4,6 <sup>a</sup>
FF	166	93,1 ± 2,4 <sup>b</sup>	2,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	45,4 ± 4,8	42 ± 4,6 <sup>b</sup>

N: número de ovocitos evaluados, PEN (%): porcentaje de ovocitos penetrados, ESPZ/OVO: número de espermatozoides por ovocito penetrado, PNM: número medio de pronúcleos, MONO (%): porcentaje de monospermia. REND: porcentaje de ovocitos monospermicos con dos pronúcleos sobre el total de ovocitos inseminados. Los valores se expresan como la media ± SEM (%). Los superíndices (*a*, *b*) en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Debido a la alta proporción de ovocitos polispermicos que se obtienen durante la fecundación *in vitro* en la especie porcina, es necesario realizar un control de FIV que nos permita estimar la producción de los posibles cigotos y que potencialmente llegarían al estadio de blastocisto.

Los resultados de FIV evaluados a las 18h de la fecundación se muestran en la Tabla 18. En ella observamos que el porcentaje de ovocitos penetrados fue superior para el grupo TALP, sin embargo, el número medio de espermatozoides por ovocito fue ligeramente superior para el caso de espermatozoides seleccionados con el FF.

En relación a la formación de pronúcleos, los resultados mostraron que era superior cuando los espermatozoides eran seleccionados con el FF, no obstante, el porcentaje de monospermia no se vio afectado por lo que el rendimiento fue inferior para el grupo FF.

Tabla 19. Embriones obtenidos con espermatozoides seleccionados utilizando el FF como quimioatrayente evaluados a las 48h y 168h post-inseminación.

TRATAMIENTOS	N°	%	%	N°	%	N°
	PRESUNTOS CIGOTOS	DIVIDIDOS (48h)	BLASTOCISTOS (168h)	CÉLULAS/BLASTOCISTOS	BLASTOCISTOS EXPANDIDOS	CÉLULAS/BLASTOCISTOS EXPANDIDOS
TALP	824	42,1 ± 7,4	27,6 ± 3,8 <sup>a</sup>	35,9 ± 2,4 <sup>a</sup>	25,4 ± 2,2 <sup>a</sup>	49,6 ± 2,1 <sup>a</sup>
FF	718	39,8 ± 7,5	38,5 ± 3,7 <sup>b</sup>	40,4 ± 2,3 <sup>b</sup>	38,3 ± 2,5 <sup>b</sup>	54,5 ± 2,4 <sup>b</sup>

Los valores se expresan como la media ± SEM (%). Los superíndices (*a*, *b*) en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). El % de blastocistos se ha calculado sobre el número de embriones divididos. El porcentaje de blastocistos expandidos se ha calculado sobre el número de blastocistos.

Después de analizar el rendimiento de la FIV y comprobar que se encontraba en valores considerados aceptables para esta especie, los potenciales embriones se transfirieron al medio de cultivo embrionario. Trascorridas 48h de la inseminación, se procedió a la evaluación de los embriones divididos y, a las 168h se evaluó el porcentaje de blastocistos (expandidos y no expandidos) así como el número de células (Tabla 19).

En relación al número de embriones que se dividieron a las 48h no se observaron diferencias en los grupos experimentales, sin embargo, cuando se analizó el estadio de blastocisto, se apreció un incremento casi del 10% respecto del grupo TALP (38,5 vs 27,6;  $p < 0,05$ ).

En cuanto al número de células por blastocisto también se observaron diferencias significativas entre grupos, siendo superior para el grupo FF (40,4 vs 35,9;  $p < 0,05$ ). No obstante, el resultado más clarificador en relación a la calidad embrionaria podría ser el número de blastocistos expandidos y

que en este caso volvió a ser superior para el grupo FF (38,3 vs 25,4;  $p < 0,05$ ). Además, estos blastocistos presentaban mayor número de células (54,5 vs 49,6;  $p < 0,05$ ), lo cual significa una mayor calidad embrionaria.





## 7. DISCUSIÓN

La fecundación interna es parte de una estrategia reproductiva que requiere que los gametos, masculino y femenino, se encuentren en el genital de la hembra. Tras el depósito del semen en el tracto reproductivo femenino, una subpoblación de los espermatozoides eyaculados se transporta al oviducto, concretamente a la zona del istmo, donde los espermatozoides se almacenan durante períodos que oscilan de horas a meses dependiendo de la especie (Holt & Fazeli, 2016).

Cuando la ovulación se produce, los espermatozoides almacenados en el istmo son liberados y progresarán hacia el lugar de fecundación (la ampolla en el caso de la especie porcina). Existe cierta controversia de cómo se liberan los espermatozoides del reservorio oviductal ya que no está claro, si la liberación se activa por cambios en el fluido del oviducto, en las células del oviducto o bien es debida a los propios espermatozoides. Centrándonos en éstos últimos, se ha hipotetizado que la liberación puede ser promovida por el desarrollo de una motilidad hiperactivada que podría vencer las fuerzas adhesivas que unen a los espermatozoides con el epitelio del oviducto (Simons *et al.*, 2014). En la especie humana, este tipo de movimiento parece ser producido por la P4 (Lishko *et al.*, 2011) cuya fuente podría ser el folículo periovulatorio a través de un mecanismo de contracorriente (Hunter *et al.*, 1983). Machado *et al.* (2019), demostraron en la especie porcina utilizando agregados celulares procedentes de oviductos, que la P4 estimula el desprendimiento de los espermatozoides de las células epiteliales de oviducto mediante activación de canales CatSper por la afluencia de  $Ca^{2+}$  al interior del espermatozoide.

Una vez liberados del epitelio, los espermatozoides deben encontrar al ovocito y dado lo angosto de la luz oviductal, este proceso no es al azar. Por ello, se plantea que los espermatozoides deberían ser atraídos por factores químicos que serían liberados por el ovocito, proceso conocido como quimiotaxis. Tanto el ovocito como el *cumulus* secretan quimioatrayentes (Sun *et al.*, 2005) sin embargo, la guía de los espermatozoides hacia el ovocito posiblemente incluya más de un quimioatrayente y otros factores físicos como por ejemplo, la diferencia de temperatura (termotaxis)

(Bahat *et al.*, 2003). No obstante, la naturaleza química de los quimioatrayentes, sus receptores afines y las vías de señalización subyacentes están sujetos aún a debate.

En cuanto a la cantidad de quimioatrayente hay cierta controversia. Así por ejemplo, en relación a la P4 algunos investigadores sugieren que es el principal quimioatrayente para los espermatozoides humanos (Wang *et al.*, 2001), mientras que otros sugieren que esta hormona no es el principal quimioatrayente o en el caso que lo fuera, sería un quimioatrayente débil (Jaiswal *et al.*, 1999). Todos estos estudios basaron sus conclusiones en ensayos realizados en rangos de alta concentración de P4 (mol/L a mmol/L). Además, los estudios que afirman una respuesta quimiotáctica positiva a P4 (Wang *et al.*, 2001) utilizaron ensayos que no podían diferenciar la quimiotaxis de otros procesos de acumulación de espermatozoides.

#### *Determinación de la actividad quimiotáctica del FF, FO, MC y P4.*

Los posibles quimioatrayentes que facilitan el encuentro espermatozoide-ovocito, deberían encontrarse como componentes quimiotácticos en el FO, FF y en las secreciones que rodean al ovocito (Oliveira *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2005). Uno de los quimioatrayentes común a los tres biofluidos mencionados es la P4, no obstante se han determinado otros compuestos y se plantea la hipótesis de que estos tengan una forma de actuación secuencial y con unas concentraciones determinadas (Oliveira *et al.*, 1999). En este sentido, se ha observado que la quimiotaxis es un fenómeno que depende de la concentración del quimioatrayente y de la especie. En mamíferos, la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides parece no ser específica de la especie. Sun *et al.* (2003) observaron que se producía una respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de conejo y humano al FF de bovino y viceversa, y que por lo tanto no era específica de la especie. No obstante, la respuesta fue mayor cuando se usaba el FF bovino. Sin embargo, la respuesta quimiotáctica homóloga en espermatozoides de porcino aún no se ha determinado.

Este estudio se realizó para investigar la capacidad quimiotáctica de los biofluidos: FF, FO, MC y la P4 sobre espermatozoides porcinos. Es importante recordar que para que ocurra la quimiotaxis, es

necesario utilizar una concentración determinada y por ello es necesario analizar varias diluciones del atrayente. Una respuesta de quimiotaxis típica está representada por una curva en forma de campana, donde a diluciones de atrayente menores o mayores no se observa respuesta quimiotáctica, pero a diluciones atrayentes intermedias la proporción de células quimiotácticas es máxima (Eisenbach, 2004). Dada la escasez de estudios en esta especie, el primer paso fue determinar la concentración a la que se producía la mayor atracción espermática.

#### *Determinación de la concentración de los biofluidos con mayor potencial quimioatrayente.*

Los resultados mostraron que la mayor atracción de los espermatozoides se logró cuando el pocillo B contenía: 0,25% de FF, 0,25% de FO, 0,13% de MC y 10 pM de P4 (respectivamente v/v). Estas concentraciones de quimioatrayente son superiores a las descritas en la bibliografía en otras especies. En este sentido Sun *et al.* (2005) mostraron que el MC inducía respuesta quimiotáctica a una dilución de 0,001-0,0001%, y Oliveira *et al.* (1999) con espermatozoides de ratón, mostraron que el FF y el FO inducían una respuesta quimiotáctica con una dilución mucha mas baja que la utilizada en este trabajo (0,001-0,00001% y 0,0001% para el FF y FO respectivamente). En la especie humana, Ralt *et al.* (1991) observó que la mejor concentración de FF se encontraba en valores comprendidos entre 0,001-0,0001% y en la especie bovina con valores de 0,0001-0,00001%. Esta variabilidad en los resultados encontrados, pueden ser atribuidas por un lado a las condiciones de trabajo, ya que los dispositivos utilizados por estos autores, así como los volúmenes de trabajo son muy diferentes y, por otro lado, se podría atribuir a la especie. No obstante, esta última suposición no la podemos corroborar con otros estudios ya que, bajo nuestro conocimiento, no hemos encontrado en la literatura revisada trabajos similares en la especie porcina. En relación a la concentración de P4, sí que hay un profundo estudio, no solo por su actividad quimiotáctica a concentraciones de rango de 1-100 pM (Teves *et al.*, 2006), sino por su participación en la activación de canales de  $Ca^{2+}$  y el movimiento hiperactivo consecuente. La concentración de P4 que mayor número de espermatozoides porcino atrajo al pocillo B, se encontraba en 10 pM y por encima de esta cantidad no se producía mayor respuesta. Resultados

similares que entraban en este rango, se observaron en espermatozoides de humano (Teves *et al.*, 2006), de conejo (Teves *et al.*, 2006) y de ratón (Guidobaldi *et al.*, 2017). Sin embargo, tampoco hemos encontrado en estudios en la especie porcina para corroborar o no nuestros resultados.

*Determinación del biofluido que proporciona el mayor porcentaje de espermatozoides seleccionados.*

Una vez determinada la concentración de los diferentes quimioatrayentes a la que mayor porcentaje de espermatozoides atraía, nos planteamos si la capacidad quimiotáctica de los biofluidos variaba entre ellos cuando se utilizaba la concentración que mayor número de espermatozoides atraía. Además, incluimos un grupo adicional, el sumatorio de todos los fluidos ( $\Sigma$ , el cual contenía la misma proporción de fluidos). Los resultados no mostraron diferencias entre los biofluidos, aunque si con el medio control. En cierta forma, este resultado no era esperado ya que, aunque todos los biofluidos presentan componentes comunes, la concentración de estos componentes es diferente. Oliveira *et al.* (1999), observaron en espermatozoides de ratón que tanto el FO como FF mejoran los parámetros de motilidad a la vez que inducían una respuesta quimiotáctica. El FO indujo a más espermatozoides a recorrer a una mayor distancia hacia el gradiente quimiotáctico, mientras el FF causó el mayor aumento en la velocidad espermática. Por otro lado, el FF a una concentración de 0,0001% tuvo la mayor respuesta quimiotáctica. No obstante, la razón por la cual los valores obtenidos para el FO fueron inferiores a los obtenidos con el FF queda por aclarar.

Por otro lado, parece lógico pensar que un quimioatrayente que lleve en su composición la mayor variedad de aquellas sustancias con las que se encontraría *in vivo*, como cuando se utilizó el sumatorio de fluidos, podría ser el que más espermatozoides atrajese. No obstante, los resultados mostraron que no producía ninguna mejora. Posiblemente, este hecho se deba a que en condiciones fisiológicas el contacto con los quimioatrayentes se produce de forma secuencial de manera que se activen unos receptores en un momento dado y ello, posteriormente, permitan la activación de otros (Sun *et al.*, 2005; Teves *et al.*, 2006). La situación que se ha planteado en este trabajo no es secuencial, por lo

que cabe la posibilidad que los diferentes receptores se activen a la vez y esto no permita un incremento en la actividad quimiotáctica.

#### *Efecto de la inhibición del calcio sobre el proceso quimiotáctico.*

En el proceso quimiotáctico se produce por un lado un movimiento hiperactivo (proceso que también se produce durante la capacitación), regulado por la activación de los canales CatSper, y por otro lado, se modifica la direccionalidad del espermatozoide hacia el quimioatrayente (Eisenbach & Giojalas, 2006). Por ello, para centrarnos solo en la direccionalidad de los espermatozoides, nos planteamos bloquear CatSper utilizando NNC 55-0396, un inhibidor del canal del  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo-T. Observamos que se producía una disminución en el porcentaje de espermatozoides que migraba hacia el quimioatrayente, sin embargo, no sacamos ninguna conclusión ya que este hecho también se producía en el grupo donde no se añadió el quimioatrayente.

La importancia del incremento del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en los espermatozoides ha sido demostrada durante la quimiotaxis (Seifert *et al.*, 2015). Se ha determinado que en presencia de los quimioatrayentes se produce la estimulación de los canales CatSper, los cuales son los responsables de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al flagelo espermático (Lishko *et al.*, 2011) hecho también demostrado en la especie porcina (Vicente-Carrillo *et al.*, 2017; Machado *et al.*, 2019). La P4 (presente en todos los biofluidos estudiados) estimula la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el espermatozoide de manera rápida. Se ha demostrado que estimula la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante la unión a un receptor no genómico. Seguidamente se activa una serin hidrolasa (ABHD2), que agota en la membrana el 2-araquidonilglicerol, dejando así de inhibir los canales  $\text{Ca}^{2+}$  (Lishko *et al.*, 2011). No obstante, en los biofluidos además de P4, hay otros componentes no identificados con la capacidad de aumentar el  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mediante la activación de CatSper (Brown *et al.*, 2017). Además, NNC 55-0396 es un inhibidor bastante inespecífico de CatSper (al menos para espermatozoides humanos). Rennhack *et al.* (2018), afirmaron que NNC 55-0396 muestra acciones adversas como un aumento considerable y sostenido de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y pHi además

de estimular la exocitosis acrosomal (Chávez *et al.*, 2018). Por tanto, estos hechos también podrían ayudar a explicar los resultados obtenidos.

A pesar que el porcentaje de espermatozoides que migraron hacia el quimioatrayente, disminuyó en presencia del inhibidor, la quimiotaxis no fue abolida por completo. Puede que otras sustancias con actividad quimiotáctica como la proteína de 8,6 kDa, similar a apolipoproteína B2 (Serrano *et al.*, 2001) o la AT III (Shuang-Lin *et al.*, 1994) sean responsables de esta migración cuando los CatSper están inhibidos. No obstante, el mecanismo por el que estimulan la motilidad estas sustancias no está dilucidado.

También se podría pensar en la posibilidad de que los espermatozoides de mamíferos tengan una respuesta quimiotáctica espacial, es decir la localización donde se unen los quimioatrayentes y una respuesta temporal, en la que la unión al receptor varía con el tiempo (Gakamsky *et al.*, 2009). En este caso el inhibidor podría actuar en la respuesta espacial pero no en la temporal. Pero esta teoría, propuesta por Khan *et al.* (1992) aún con resultados prometedores tal y como describen Armon y Eisenbach (2011), debe ser demostrada.

#### *Análisis de las proteínas y metabolitos en los biofluidos mediante HPLC-MS.*

La P4 se ha identificado como el principal quimioatrayente en los biofluidos FO, FF y MC. Sin embargo, existen otros componentes en los fluidos que también podrían tener esta propiedad. Por ello decidimos determinar la concentración de E2, P4, AMPc y GMPc en los biofluidos utilizados como quimioatrayentes.

Observamos que todos estos componentes aparecían en los biofluidos utilizados, aunque con concentraciones diferentes. En cuanto al FF, a excepción del AMPc, es el que presenta los valores más altos en relación a los otros biofluidos. Por ello, debería ser el que mayor poder de quimioatracción tuviese, sin embargo no hubo diferencias en el porcentaje de espermatozoides seleccionados entre los biofluidos estudiados. Tal vez, unos componentes puedan compensar el efecto de otros que se encuentran en menor cantidad o que la concentración necesaria sea muy baja. Por

ejemplo, el GMPc, es menos sensible que el AMPc pero presenta una respuesta más intensa (Gakamsky *et al.*, 2009).

Los biofluidos presentan una actividad compleja y, en su presencia, los espermatozoides están expuestos simultáneamente a múltiples ligandos, lo que puede conducir a múltiples efectos y/o interacciones por separado. Así por ejemplo, el pre-tratamiento con estrógenos, eleva el  $[Ca^{2+}]_i$  en los espermatozoides aparentemente por un mecanismo independiente de CatSper (Luconi *et al.*, 1999; Lishko *et al.*, 2011), y reduce el  $Ca^{2+}$  en respuesta a la estimulación posterior con P4. 17- $\beta$ -estradiol presente en FF, FO y MC podrían inhibir la acción estimuladora de P4 y se esperaría que sus acciones den como resultado una respuesta a los biofluidos menor que la de un equivalente de P4 (Mannowetz *et al.*, 2017). Sin embargo, la concentración de P4 en los biofluidos puede ser lo suficientemente alta como para que estos efectos inhibitorios se superen (Mannowetz *et al.*, 2017), por lo que los efectos estimuladores observados con los biofluidos indican que otros componentes de estos, cuando están presentes a una concentración suficiente, activen (o suprima la inactivación) a CatSper o a otros componentes de señalización de  $[Ca^{2+}]_i$  que contribuyan a la señal sostenida de  $[Ca^{2+}]_i$  (Brown *et al.*, 2017).

Otra cuestión que nos podríamos plantear es el porqué de la presencia de los segundos mensajeros, AMPc y GMPc, en los biofluidos y el papel que tienen en el proceso quimiotáctico. Se ha determinado que la señalización purinérgica es un componente clave en la fisiología de varios tejidos. Mediante la autoproducción de nucleótidos y nucleósidos y su unión a receptores específicos, se modula una amplia gama de respuestas celulares, como el crecimiento celular, la diferenciación y la motilidad. Un ejemplo claro de la importancia de estos nucleótidos fue mostrado por Osycka-Salut *et al.* (2014). Estos autores demostraron que la presencia de  $HCO_3^-$  en los medios de incubación espermática producía un aumento temprano de AMPc dependiente de ACs, no solo en el espacio intracelular, sino también en el extracelular, lo que sugiere un flujo de AMPc a partir de espermatozoides. Posteriormente detectaron la presencia de MRP4 (*multidrug resistance protein 4*), en la membrana

apical y es el principal transportador asociado con la salida de AMPc. Cuando se inhibió MRP4 con probenecid, un inhibidor de MRP de amplio espectro, los espermatozoides no bombearon AMPc y no pudieron capacitarse. Sin embargo, cuando el medio de incubación se complementó con AMPc, se restableció la capacitación. Otra posible función de estos nucleótidos podría ser la de indicar a los espermatozoides la dirección hacia donde deben ir para fecundar como en el caso del erizo de mar (Trötschel *et al.*, 2020).

*i) Proteínas relacionadas con la quimiotaxis identificadas por HPLC-MS/MS en FF, FO y MC.*

A lo largo de esta tesis hemos mencionado varios componentes identificados en los biofluidos estudiados con capacidad quimiotáctica. Sin embargo, además de estos componentes, también hemos identificado proteínas relacionadas con la quimiotaxis. Mediante el diagrama de Venn hemos determinado las proteínas en común que tienen dichos biofluidos.

En el FF se identifica GC, esta proteína forma parte de una gran familia de nucleótidos ciclasas. La GC además de sintetizar GMPc, controla varias funciones sensoriales en muchas especies (Pichlo *et al.*, 2014). También hemos identificado PNA en el FF, que como es sabido, es una proteína secretada por la porción atrial de corazón y en muchos otros tejidos, incluso en el FF. Entre una de sus funciones se encuentra activar la GC (Sundsfjord *et al.*, 1989; Brenner *et al.*, 1990; Ruskoaho, 1992). En los estudios realizados por Anderson *et al.* (1995) en el FF humano, observaron que el PNA no tenía actividad quimioatrayente. Sin embargo, existe un receptor en la pieza intermedia de espermatozoide específico para la actividad quimioatrayente del PNA que está asociada a la GC. En nuestro estudio no hemos estudiado el efecto directo de GC y PNA, no obstante, ambas proteínas involucradas en la quimiotaxis han sido identificadas en el FF. Este resultado sugiere que ambas podrían actuar sobre el espermatozoide para su atracción.

Otro compuesto que se identificó en el FF es la guanilina. Este es un péptido que pertenece a la gran familia de péptidos natriuréticos, que a su vez pertenece a tres subclases de péptidos (guanilina, uroguanilina, linfoguanilina) sintetizados principalmente en el intestino y en los riñones (Sindić &

Schlatter, 2006). A pesar que se demostró la expresión de este péptido en varios tejidos, entre ellos testículos (Sindić & Schlatter, 2006), no hemos encontrado ningún trabajo en la literatura que haga mención de la presencia de guanilina en el FF. En todo caso, su función es aumentar la actividad de GC mediante su unión y activación de los receptores de GC (Garbers *et al.*, 2006; Fonteles & Nascimento, 2011).

AC también ha sido identificada en el FF. Esta proteína se encuentra en la membrana plasmática del espermatozoide y es la responsable de sintetizar el AMPc a partir de ATP (Cisneros-Mejorado *et al.*, 2014). En el flagelo de espermatozoides humanos se identificaron receptores olfativos OR17-4 (Spehr *et al.*, 2003) y OR23 en espermátidas redondas de ratón (Fukuda *et al.*, 2004) así como bourgeonal y lyral que son quimioatrayentes espermáticos. Sin embargo, para que se lleve a cabo la actividad quimiotáctica en los espermatozoides depende de activación de dichos receptores, los cuales se activan mediante la activación de una AC situada en la membrana del flagelo (Spehr *et al.*, 2004).

Igualmente se ha observado que en el oviducto, un gradiente del precursor del péptido natriurético A (PPNA) interactúa con el receptor de GC del péptido natriurético (NPR1) en el espermatozoide a través de la vía proteína quinasa (PK) dependiente de GMPc, en la que participa GMPc, para inducir la quimiotaxis de espermatozoide y mejorar el nivel intracelular de  $Ca^{2+}$  (Bian *et al.*, 2012). Este resultado está acorde con nuestros resultados donde observamos también que la proteína GC identificada en el FO está relacionada con la quimiotaxis. Además, también hemos identificado la proteína AC. Esta proteína está presente en el oviducto (Cometti *et al.*, 2003) y en esta región, el nivel de  $HCO_3^-$  modula su actividad de manera que facilita el incremento de AMPc. De esta forma se estimula la respiración del espermatozoide, controla el batido del flagelo, la capacitación, y media la respuesta quimiotáctica (Cook *et al.*, 1994; Walensky *et al.*, 1995; Buck & Levin, 2011).

Tornell *et al.* (1990) cuando estudiaron el efecto de PNA en maduración espontánea de ovocitos de rata, demostraron que las células del *cumulus* tenían receptores para el PNA y también la presencia de GC. Además, estudios realizados en la especie porcina también demostraron la presencia de PNA

en las células de la granulosa y su correlación con el PNA presente en el FF, de esta manera estos autores sugieren que las células de la granulosa sintetizan y secretan el PNA al FF (Kim *et al.*, 1992). Asimismo, en nuestro estudio encontramos la presencia del PNA en el MC, que actuaría activando la GC para que desempeñe su función en la quimiotaxis.

En los estudios realizados por Tanii *et al.* (2011) identificaron el polipéptido activador de la AC de la pituitaria en los espermatozoides, y también identificaron el receptor de polipéptido activador de la AC de la pituitaria exclusivamente en las células del *cumulus*. Estos autores sugieren que las células del *cumulus*, en respuesta a polipéptido activador de la AC de la pituitaria en los espermatozoides, secretan una o más factores que estimulan el movimiento de los espermatozoides hacia las células del *cumulus*, y consecuentemente, hacia el ovocito.

En lo que respecta a las proteínas identificadas en cada uno de los biofluidos con capacidad quimiotáctica estudiadas, hemos querido averiguar si existía alguna relación entre ellas. Para ello, hemos usado el diagrama de Venn. Mediante este diagrama hemos observado que la GC es la única proteína en común entre los tres biofluidos, y curiosamente observamos un comportamiento parecido entre los biofluidos como sustenta la literatura citada, donde la PNA no muestra tener efecto directo en los biofluidos, sin embargo, actúa activando los receptores de la GC en los espermatozoides.

#### *Características morfológicas y funcionales de los espermatozoides que migraron hacia el quimioatrayente.*

Tras la cópula, de los millones de espermatozoides que son eyaculados, solo una subpoblación será la seleccionada para alcanzar el reservorio oviductal. Aquellos espermatozoides con la mayor capacidad de fecundación y las mejores características para apoyar el desarrollo del embrión serán los que tengan la oportunidad de fecundar al ovocito (Sakkas *et al.*, 2015). Se ha propuesto que una de las razones de la relativa baja eficiencia de las TRA es que se carece de una metodología efectiva para separar esta subpoblación espermática de forma específica para su uso en las TRA (Pérez-Cereales *et al.*, 2018). Por lo tanto, dado que se ha demostrado que solo los espermatozoides

capacitados responden a la quimiotaxis, se podría utilizar esta propiedad espermática para la selección de esa subpoblación (Oren-Benaroya *et al.*, 2008).

#### *Integridad de la membrana acrosomal de espermatozoides porcino.*

En relación a la integridad del acrosoma, observamos que los espermatozoides seleccionados con el uso de FO como quimioatrayente presentaron el valor más alto de acrosomas íntegros, siendo el más bajo para el grupo  $\Sigma$ . Estos resultados se explican en base a la composición de los quimioatrayentes, es decir, el FO periovulatorio contiene proteínas que estabilizan la membrana espermática y por tanto la integridad del acrosoma (Coy *et al.*, 2010). Soriano-Úbeda *et al.* (2017) observaron que la incubación de espermatozoides en medio de capacitación con FO periovulatorio mantenía la integridad del acrosoma, más tarde Zapata-Carmona *et al.* (2019) mostraron que este efecto era reversible y dependía de la fase del ciclo en la que se había obtenido el FO, por lo que la fecundación ocurrirá cuando los espermatozoides entren en contacto con las células del *cumulus*. Por otro lado, tenemos el caso de los espermatozoides que estuvieron en contacto con todos los biofluidos juntos ( $\Sigma$ ). Este fluido a pesar de llevar en su composición el FO que estabiliza la membrana plasmática de espermatozoide, también contiene la secreción de las células del *cumulus*, el FF y por ello la P4 y otras moléculas que inducen la reacción acrosómica en espermatozoides capacitados (Calogero *et al.*, 2000; Patrat *et al.*, 2000).

#### *Evaluación de la motilidad de los espermatozoides.*

Cuando los espermatozoides de los mamíferos se capacitan, adquieren, entre otras funciones, la capacidad de respuesta quimiotáctica y la capacidad de exhibir eventos ocasionales de motilidad hiperactivada, un tipo de motilidad vigorosa con grandes amplitudes de desplazamiento de la cabeza. A pesar de que Armon y Eisenbach, (2011) proporcionaron evidencias que sugieren que la hiperactivación es parte de la respuesta quimiotáctica, los resultados encontrados en nuestro estudio en relación a los parámetros cinéticos evaluados mediante el CASA, no mostraron diferencias entre los grupos experimentales. Sin embargo, no podemos argumentar con otros autores si la motilidad se

ve afectada o no por la quimiotaxis ya que existe cierta controversia en la literatura consultada. Así, por ejemplo en la especie humana, por un lado, Fabbri *et al.* (1998), observaron un incremento en la motilidad y la hiperactivación, pero, por otro lado, Isobe *et al.* (2002) no observaron que dichos parámetros se vieran afectados.

En nuestro estudio, la motilidad espermática fue analizada tras haber migrado los espermatozoides al quimioatrayente. Tal vez, las diferencias con otros autores se deban a esta situación. Armon y Eisenbach, (2011) analizaron la trayectoria de los espermatozoides nadando en un gradiente de quimioatrayente espacial y observaron que el nivel de eventos de hiperactivación era significativamente más bajo que en los controles. Ellos sugirieron que al detectar un aumento en la concentración de quimioatrayente, las células capacitadas reprimen sus eventos de hiperactivación y, por lo tanto, mantienen su curso de natación hacia el quimioatrayente. Sin embargo, en nuestro trabajo no se realizó en un gradiente creciente de concentración sino una vez que los espermatozoides ya habían migrado y se encontraban inmersos en el quimioatrayente.

#### *Respuesta espermática a condiciones de hipoosmolaridad: Test hipoosmótico.*

Está demostrado que la capacitación implica varios cambios en el espermatozoide (Molina *et al.*, 2018), por lo tanto, la integridad de la membrana espermática y su funcionalidad pueden verse afectadas. La capacidad de la cola del espermatozoide para hincharse en presencia de una solución hipoosmótica es un indicador de la integridad de la membrana del espermatozoide, ya que solo las células con membranas intactas (células vivas) se hincharán en soluciones hipotónicas, y por ello presentarán una actividad funcional normal (Chan *et al.*, 1985).

Los resultados del test hipoosmótico de los espermatozoides bajo los diferentes tratamientos mostraron que la respuesta a condiciones hipoosmóticas fue menor en ausencia de quimioatrayente. Por lo que aquellos espermatozoides con membranas funcionales fueron los que migraron hacia los quimioatrayentes. Estos datos resultan curiosos ya que se ha demostrado que la capacitación ejerce un efecto negativo sobre la integridad de la membrana (Harrison, 1996) y Martinez *et al.* (1996)

observaron que los procesos de lavados de espermatozoides durante la capacitación podían afectar la membrana espermática. En este mismo sentido Lechniak *et al.* (2002) mostraron que espermatozoides capacitados tenían menor respuesta al hinchamiento del flagelo. No obstante, no hemos encontrado estudios que realicen este test a espermatozoides que han migrado hacia un quimioatrayente, y podríamos pensar que estos espermatozoides han sido seleccionados y funcionalmente sean mejores.

*Localización de la fosforilación de la tirosina en espermatozoides porcino seleccionados mediante quimioatrayentes.*

Uno de los mecanismos más comúnmente utilizado por las células eucariotas para regular la actividad de proteínas es mediante la adición o eliminación de grupos fosfato en residuos de serina, treonina o de tirosina (Guo *et al.*, 2019). Existen numerosos estudios desarrollados en espermatozoides de cerdo en los que se relaciona la fosforilación en tirosina de determinadas proteínas con la capacitación (Kaláb *et al.*, 1998; Flesch *et al.*, 1999; Dubé *et al.*, 2003) y con la reacción acrosómica (Kaláb *et al.*, 1998). Uno de los mayores esfuerzos para establecer la relación entre las diferentes proteínas fosforiladas con una función específica, ha sido localizar las proteínas fosforiladas en tirosina en las regiones del espermatozoide. Dado que la región apical en el espermatozoide está involucrada en la interacción espermatozoide-ovocito, el cambio del patrón de fosforilación de las regiones podría tener una significancia fisiológica durante la fecundación (Naz & Rajesh, 2004).

Cuando analizamos la fosforilación de la tirosina en espermatozoides observamos que todos los espermatozoides que habían estado en contacto con el TALP, tanto los que habían migrado hacia los quimioatrayentes como los que se incubaron con TALP, presentaron un incremento en el porcentaje de fosforilación de la tirosina en el patrón de capacitación III, es decir acrosoma y segmento ecuatorial. En cambio, en espermatozoides eyaculados sin recibir ningún tratamiento mostraron que el patrón más elevado era el I (no fosforilado). Resultados similares fueron obtenidos por Teves *et al.* (2009) con espermatozoides humanos principalmente para el patrón definido por la fosforilación del segmento ecuatorial y acrosoma (Patrón III en nuestro estudio). Aunque estos autores describieron

hasta 8 patrones, tampoco encontraron diferencias entre los capacitados que migraron hacia la P4 y los que estaban capacitados.

Al analizar los patrones de fosforilación entre los grupos experimentales no apreciamos diferencias entre ellos. Este hecho podría ser atribuido a la composición del medio de capacitación con altos niveles de calcio, BSA y bicarbonato de manera que la respuesta en todos los casos sería la máxima. Soriano-Úbeda *et al.* (2017) y Zapata-Carmona *et al.* (2019), mostraron que el FO disminuía la fosforilación de tirosina, pero las concentraciones del fluido en sus experimentos eran superiores a las utilizadas en este trabajo y se ha demostrado que el efecto del FO es dosis dependiente. En cuanto al efecto del FF y MC sobre la fosforilación de tirosina, Soriano *et al.*, (2017) y Zapata-Carmona *et al.*, (2019) tampoco encontraron modificación alguna. Se sabe que el FF contiene adenosina y que actúa como modulador de la producción de AMPc y provoca el aumento en el patrón de fosforilación de tirosina por la activación de la vía AMPc (Fraser, 2008), pero tal y como se ha comentado anteriormente, la composición del medio de capacitación podrían enmascarar el efecto de estos fluidos sobre los patrones de fosforilación.

#### *Efecto de la selección espermática por quimiotaxis sobre la fecundación in vitro.*

Los resultados de la FIV mostraron que el mayor porcentaje de penetración fue cuando el FF se usó como quimioatrayente, aunque el número de espermatozoides por ovocito no se vio afectado. Una explicación plausible podría ser que el FF mejora la capacitación y la reacción del acrosoma (Hong *et al.*, 1993) y, en consecuencia, el aumento de la penetración. Sin embargo, el número de espermatozoides por ovocito también debería verse incrementado (Funahashi, 2003). En este sentido, Funahashi y Day (1993) observaron que la incubación previa a la fecundación de los espermatozoides porcinos en concentraciones adecuadas de FF porcino reducía efectivamente la incidencia de polispermia. Además, sus resultados indicaron que el bloqueo de la polispermia se debe a una interacción entre FF y los espermatozoides y no es el resultado de los efectos sobre los ovocitos. Pero también podría ser que el FF fuese el atrayente que selecciona la subpoblación de espermatozoides

de más calidad y, por lo tanto, la penetración también fue la más alta. Estos hechos están respaldados por los resultados de Ralt *et al.* (1991), que informaron que los espermatozoides humanos se acumulan en el FF y está fuertemente correlacionado con la fecundación del ovocito. Sin embargo, en condiciones *in vivo*, el espermatozoide se encuentra con otros biofluidos y el tipo de selección y atracción hacia el ovocito incluye otras biomoléculas aparte de las que presenta el FF.

Con respecto a la tasa de penetración más baja que se obtuvo cuando se seleccionaron los espermatozoides con FO, podría deberse a la presencia de factores que impiden una capacitación antes que el espermatozoide entre en contacto con el ovocito. En este sentido, para evitar la capacitación prematura durante el tránsito epididimario y en la eyaculación, los espermatozoides adquieren factores de decapitación (FD). Uno de estos FD estimula la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa para disminuir el  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , una tarea realizada principalmente por PMCA4 (Martin-DeLeon, 2016). Durante la capacitación, los FD se pierden y el  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se eleva (Matás *et al.*, 2010). Por lo tanto, la adquisición de PMCA4 adicional en el oviducto a través de exosomas (Al-Dossary *et al.*, 2013) sería ventajosa para garantizar un flujo de salida de  $\text{Ca}^{2+}$  adecuado para promover la viabilidad de los espermatozoides y prevenir una reacción prematura del acrosoma. Este hecho está respaldado por los resultados obtenidos por Soriano-Úbeda *et al.* (2017) que observaron que FO, disminuyeron la actividad de la PKA de espermatozoides y por otro lado, Zapata-Carmona *et al.* (2019), mostraron que el efecto de FO sobre PKA y la fosforilación de tirosina era reversible permitiendo la fecundación. Por lo tanto, es posible que algunos factores del FO disminuyan la capacitación de los espermatozoides y después otros factores producidos por el ovocito atraigan al espermatozoide y lo preparen para la fecundación (Armon *et al.*, 2014).

Por otro lado, la baja tasa de penetración obtenida con los espermatozoides seleccionados con  $\Sigma$  (FF+FO+MC), podía deberse a la menor eficacia del FO en el control de reacción acrosómica prematura de los espermatozoides. Estos, al estar inmersos en un medio que, a pesar de contener FO en su composición, también contiene MC, FF por consiguiente P4 y otras moléculas que inducen la

reacción acrosómica en espermatozoides capacitados (Calogero *et al.*, 2000; Patrat *et al.*, 2000). Por lo tanto, es probable que la presencia de PMCA4 (Al-Dossary *et al.*, 2013) presente en el FO que garantizaría el flujo adecuado de la salida de  $\text{Ca}^{2+}$ , no fuera capaz de controlar el incremento de la reacción acrosómica prematura, y consecuentemente la disponibilidad de espermatozoides viables para fecundar.

#### *Evaluación de la fragmentación del ADN espermático.*

La fragmentación del ADN en los espermatozoides y los resultados de TRA se ha investigado ampliamente, junto con la fecundación, el desarrollo embrionario, la implantación, los defectos congénitos en la descendencia y la pérdida temprana del embarazo (Esbert *et al.*, 2011; Salehi *et al.*, 2019). Por lo tanto, esta experiencia se basó en una selección de espermatozoides porcino de buena calidad a través de la evaluación de la morfología y de la fragmentación del ADN. Cuando analizamos la fragmentación del ADN en la especie porcina tras selección por quimiotaxis, no encontramos ninguna diferencia entre los tratamientos, tanto si fueron evaluados mediante el ensayo con naranja de acridina como con el test de dispersión de la cromatina (Halomax®). Estos resultados no coinciden con otros estudios realizados en humanos, donde se ha conseguido una mejora en la calidad seminal, incluyendo una disminución de la proporción de espermatozoides con fragmentación del ADN, tras seleccionar espermatozoides mediante un sistema de quimiotaxis basado en un gradiente de P4 (Gatica *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2018). Es cierto que existen diferencias especie-específicas en cuanto al tipo de protaminas que empaquetan el ADN. Cuando se encuentran las protaminas 1 y 2 la probabilidad de que el ADN se fragmente es mayor que cuando solamente encontramos las de tipo 1, como en el caso de los espermatozoides porcinos, ya que esta protamina aporta mayor estabilidad al ADN frente a condiciones adversas (Alkmin *et al.*, 2013). Esta diferencia de resultados probablemente es debida a la especie, ya que el porcentaje de fragmentación del ADN que presentan los espermatozoides porcinos es muy bajo (menor al 5%) (Batista *et al.*, 2016).

*Efecto de la selección espermática por el fluido folicular sobre la calidad embrionaria.*

Hasta hace unos años la investigación sobre la calidad embrionaria se centraba principalmente en evaluar el impacto de los factores maternos sobre el embrión. Sin embargo, recientemente se ha determinado que los factores paternos también comparten la responsabilidad de contribuir a una mejor calidad embrionaria. No obstante, a pesar de ello, hay que tener en cuenta que el desarrollo de las TRA, particularmente el éxito de ICSI, ha aumentado la posibilidad de que un espermatozoide anormal sea seleccionado para la fecundación y participe en la formación de un embrión con un futuro incierto (Colaco & Sakkas, 2018).

En la actualidad, técnicas de selección espermática, como la centrifugación en gradiente de densidad o *swim-up*, se utilizan de forma rutinaria con el objetivo de seleccionar los espermatozoides para la fecundación. Desafortunadamente, estas técnicas no tienen como objetivo la evaluación de características espermáticas, como la apoptosis, la integridad del ADN, la maduración o la ultraestructura de la membrana, todo lo cual contribuiría a mejorar significativamente la calidad del embrión.

En nuestro trabajo hemos analizado la calidad de los embriones obtenidos con espermatozoides seleccionados mediante un gradiente de densidad y embriones obtenidos con espermatozoides que, tras haber sido seleccionados por el gradiente de densidad, migraron hacia el FF. Los resultados mostraron que no hubo diferencias en el porcentaje de embriones divididos a las 48h, pero sí posteriormente, concretamente en el % de blastocistos y blastocistos expandidos, así como en el número de células de ambos tipos de blastocistos. En ambos casos, la mejor calidad fue mayor para el grupo de espermatozoides que migraron hacia el FF.

En 1994, Janny y Menezo, observaron que las tasas de división y de formación de blastocistos eran significativamente más bajas cuando se utilizaron espermatozoides congelados o morfológicamente anormales para fecundar ovocitos en FIV y aún descendían más después de la ICSI (Shoukir *et al.*, 1998). Sin embargo, estos resultados no ayudan a explicar las diferencias encontradas en nuestros

grupos experimentales ya que en ambos casos los espermatozoides no presentaban formas anormales y la motilidad era buena.

Se ha determinado que los espermatozoides que contienen anomalías en la estructura de la cromatina, ADN fragmentado, microdelección del cromosoma Y, número anormal de cromosomas o una impronta genética alterada pueden estar asociados con alteraciones de la fecundación, embriogénesis o desarrollo embrionario (Colaco & Sakkas, 2018). Dominguez *et al.* (2018), obtuvieron embriones de mejor calidad cuando utilizaron espermatozoides seleccionados por quimiotaxis y argumentaron que era debido a un menor daño en el ADN. Sin embargo, en nuestro trabajo con las dos técnicas utilizadas para determinar daño acrosomal, no encontramos diferencias en el daño del ADN en ninguno de los grupos experimentales y en la mayoría de casos era muy bajo o nulo. No obstante, hay que tener en cuenta que existe una gran diferencia en la sensibilidad de las pruebas dando una alta heterogeneidad en los resultados, así como en los diferentes enfoques para evaluar un solo parámetro espermático.

Resulta interesante observar que las diferencias entre los grupos aparecen a las 168h de cultivo embrionario en estadio de blastocisto. Este hecho nos induce a pensar que no solo la selección por el FF sea importante para obtener espermatozoides de mayor calidad, sino que este fluido pueda aportar al espermatozoide ciertas sustancias que mejoren el posterior desarrollo embrionario. En base a estos datos, podríamos hipotetizar que los resultados obtenidos, podrían estar regulados por las vesículas extracelulares (VE) presentes en el FF. Estas vesículas inducen la señalización a través de diferentes mecanismos, modulan el estado fisiológico de la célula receptora y parecen tener un papel clave en la regulación de la fisiología espermática (Franchi *et al.*, 2020). Se ha observado que una breve co-incubación, es suficiente para que tenga lugar la transferencia de componentes desde las VE a los espermatozoides participando en el proceso de capacitación espermática a la vez que aporta diferentes tipos de ARN. Todo ello podría justificar la mejora en la calidad de los embriones obtenidos con espermatozoides seleccionados por quimiotaxis hacia el FF.

Otra explicación plausible es que los espermatozoides que respondieron a la quimiotaxis hacia el FF posean el grado de metilación adecuado para la correcta activación del genoma embrionario. Parece ser que las anomalías epigenética o de metilación (Laurentino *et al.*, 2016) son candidatos potenciales responsables de la infertilidad. En este sentido se ha indicado que los patrones de metilación del ADN del espermatozoide podrían predecir la calidad del embrión durante la FIV (Aston *et al.*, 2015) y parece ser que tal efecto, se observa en etapas posteriores de las primeras divisiones embrionarias. En la etapa de cuatro a ocho células, el genoma cigótico se activa y se elimina la dependencia de los ARNm y las proteínas maternos (Braude *et al.*, 1988). Además, ha sido demostrado el papel de los ARN derivados de los espermatozoides en la regulación epigenética de la expresión génica en el embrión temprano y también en la vida adulta de la descendencia (Chen *et al.*, 2016). La ausencia de miARN aportada por los espermatozoides da como resultado un retraso en el desarrollo del cigoto (Liu *et al.*, 2012). En cualquier caso, serían necesarios estudios epigenéticos en ambos grupos de espermatozoides que apoyasen la teoría anteriormente expuesta.

La calidad del embrión se evalúa sobre la base de varios parámetros: morfológicos, de desarrollo, genéticos y metabólicos. Estos incluyen la medición de la velocidad de escisión, la cinética y la sincronía de la división. En este trabajo hemos observado que la velocidad de los blastocistos para expandirse es mayor cuando los espermatozoides eran seleccionados por quimiotaxis hacia el FF. Apoyando esta teoría se encuentran los trabajos de Fatehi *et al.* (2006) y Knez *et al.* (2013) en los que observan que los embriones bovinos en etapa de división más rápida tienen más probabilidades de convertirse en blastocistos y los embriones de división rápida se asocian con tasas de gestación más altas.

En cualquier caso, aunque los resultados apuntan hacia una mejora en la obtención de embriones de mayor calidad utilizando espermatozoides seleccionados mediante quimiotaxis hacia el FF, es necesario realizar estudios complementarios que ayuden a explicar los motivos de este hecho.



**CONCLUSIONES/CONCLUSIONS**



## Conclusiones

1. La mayor respuesta quimiotáctica de los espermatozoides ocurrió con bajas concentraciones de los quimioatrayentes siendo 0,25% para FF y FO y 0,13% para el caso del MC.
2. El sumatorio de todos los biofluidos ( $\Sigma$ ) no incrementó el efecto quimiotáctico que presentaron los fluidos utilizados de forma individual.
3. Los espermatozoides seleccionados por los quimioatrayentes presentaron mejores características funcionales y bioquímicas cuando se sometieron a una condición hipoosmótica.
4. Únicamente la selección espermática con el uso del FF como quimioatrayente incrementó el porcentaje de ovocitos penetrados durante la fecundación *in vitro*.
5. La selección de espermatozoides mediante el quimioatrayente FF mejoró la calidad embrionaria y la velocidad de desarrollo del embrión.

Como conclusión general de este trabajo, podemos decir que el ensayo de selección espermática, basado en la quimiotaxis de espermatozoides hacia el fluido folicular, proporciona una subpoblación de espermatozoides enriquecidos, con células capacitadas y en un estado fisiológico óptimo. Por ello, la aplicación de este ensayo podría mejorar las técnicas de reproducción asistida actuales.



## Conclusions

1. Sperm showed the greater chemotactic response with low concentrations of the chemoattractant. Specifically, they were 0.25% for of FF and OF and, 0.13% for CM.
2. The sum of all biofluids ( $\Sigma$ ) did not increase the chemotactic effect of single fluids.
3. Sperm selected by chemoattractants showed better functional and biochemical characteristics when subjected to hypoosmotic condition.
4. Sperm selection with the use of FF as chemoattractant increased the percentage of oocytes penetrated during *in vitro* fertilization.
5. Sperm selection with the use of FF as chemoattractant improved embryo quality and velocity of embryo development.

In conclusion, the sperm selection assay, based on sperm chemotaxis towards follicular fluid, provides a subpopulation of enriched sperm, with capacitated cells and an optimal physiological state. Therefore, the application of this assay could improve current assisted reproduction techniques.







*Abreviaturas*

[AMPc]<sub>i</sub>: Adenosín monofosfato cíclico 3'5' intracelular

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>: Calcio intracelular

[H<sup>+</sup>]<sub>i</sub>: Hidrogeno intracelular

2AG: 2-araquidonoilglicerol

AC: Adenilato ciclasa

ACs: Adenilato ciclasa soluble

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AH: Ácido hialurónico

ALH: Amplitud desplazamiento lateral de la cabeza

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico 3'5'

ARN: Ácido ribonucleico

AT III: Antitrombina III

ATP: Adenosín trifosfato

bbCID: Broad Band Collision Induced Dissociation

BCF: Frecuencia de batido de la cabeza

BSA: Albúmina de suero bovino

BTS: BetsvilleThawing Solution

Ca<sup>2+</sup>: Calcio

CASA: Computer Assisted Semen Analysis

CNG: Canales de nucleótido cíclico

CNG: Canales dependientes de nucleótidos cíclicos

COC: Complejo cumulus-ovocito

dbAMPc: Dibutilil adenosin monofosfato cíclico

DTT: Ditioneitol

E2: Estradiol

eCG: Gonadotropina coriónica de yegua preñada

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EHS-3: enzima hialuronano sintasa 3

ESI: Ionización por electrospray

ESPZ/OVO: Número de espermatozoides por ovocito penetrado

FD: Factores de decapitación

FF: Fluido folicular

FITC: Isocianato de fluoresceína

FIV: Fecundación *in vitro*

FO: Fluido oviductal

GAG: Glicosaminoglicano

GC: Guanilato ciclasa

GCs: Guanilato ciclasa soluble

GMPc: Guanosín monofosfato cíclico

GVP: Gestión Veterinaria Porcina

HCG: Gonadotropina coriónica humana

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Bicarbonato

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

LIN: Índice de linealidad

MC: Medio condicionado

MIV: Maduración *in vitro*

MONO (%): Porcentaje de monospermia

Mot. Prog: Motilidad progresiva

Mot. Total: Motilidad total

N: Número de ovocitos evaluados

Na<sup>+</sup>: Sodio

NCSU 37: North Carolina State University-37

NPR1: Receptor de la GC del péptido natriurético

ON: Óxido nítrico

ONs: Óxido nítrico sintasa

P4: Progesterona

PBS: Phosphate Buffer Solution

PDE: Fosfodiesterasa tipo 3

PEN (%): Porcentaje de ovocitos penetrados

PG: Prostaglandina

pHi: pH intracelular

PK: Proteína quinasa

PKA: Proteína quinasa A

PKG: Proteína quinasa G

pM: Picomolar

PNA: Lectina Arachishypogaea

PNA: Péptido natriurético atrial

PNM: Número medio de pronúcleos

PPNA: Precursor del péptido natriurético A

PVA: Alcohol de polivinilo

RA: Reacción acrosomal

RE: Reservorio espermático

REND: Porcentaje de ovocitos monospermicos con dos pronúcleos sobre el total de ovocitos  
inseminados

SCDT: Test de dispersión de la cromatina espermática

SSF: Solución salina fisiológica

STR: Índice de rectitud

TRA: Técnicas de Reproducción Asistida

Tto: Tratamiento

VAP: Velocidad media

VCL: Velocidad curvilínea

VSL: Velocidad rectilínea

WOB: Índice de oscilación

ZP binding: Espermatozoides unidos a la zona pelúcida

ZP: Zona pelucida



**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



*Referencias Bibliográficas*

- Al-Dossary, A. A., Strehler, E. E., & Martin-DeLeon, P. A. (2013). Expression and Secretion of Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase 4a (PMCA4a) during Murine Estrus: Association with Oviductal Exosomes and Uptake in Sperm. *PLoS ONE*, 8(11), e80181.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080181>
- Alam, R., Stafford, S., Forsythe, P., Harrison, R., Faubion, D., Lett-Brown, M. A., & Grant, J. A. (1993). RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 150(8 Pt 1), 3442–3448.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7682241>
- Alkmin, D. V., Martinez-Alborcia, M. J., Parrilla, I., Vazquez, J. M., Martinez, E. A., & Roca, J. (2013). The nuclear DNA longevity in cryopreserved boar spermatozoa assessed using the Sperm-Sus-Halomax. *Theriogenology*, 79(9), 1294–1300.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.02.026>
- Almiñana, C., & Bauersachs, S. (2020). Extracellular vesicles: Multi-signal messengers in the gametes/embryo-oviduct cross-talk. *Theriogenology*, 150, 59–69.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.077>
- Anderson, R. A., Feathergill, K. A., Rawlins, R. G., Mack, S. R., & Zaneveld, L. J. D. (1995). Atrial natriuretic peptide: A chemoattractant of human spermatozoa by a guanylate cyclase-dependent pathway. *Molecular Reproduction and Development*, 40(3), 371–378.  
<https://doi.org/10.1002/mrd.1080400314>
- Appay, V., & Rowland-Jones, S. L. (2001). RANTES: A versatile and controversial chemokine. In *Trends in Immunology (Vol. 22, Issue 2, pp. 83–87)*. Trends Immunol.  
[https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(00\)01812-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(00)01812-3)
- Arienti, G., Carlini, E., Saccardi, C., & Palmerini, C. A. (2004). Role of human prostasomes in the

activation of spermatozoa. In *Journal of Cellular and Molecular Medicine* (Vol. 8, Issue 1, pp. 77–84). *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2004.tb00261.x>

Armon, L., Ben-Ami, I., Ron-El, R., & Eisenbach, M. (2014). Human oocyte-derived sperm chemoattractant is a hydrophobic molecule associated with a carrier protein. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.06.011>

Armon, L., & Eisenbach, M. (2011). Behavioral mechanism during human sperm chemotaxis: involvement of hyperactivation. *PloS One*, 6(12), e28359. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028359>

Arnoult, C., Pierre, V., & Ray, P. F. (2011). Le chimiotactisme du spermatozoïde est régulé par la fixation de la progestérone sur le canal calcique CATSPER. *Médecine/Sciences*, 27(8–9), 702–704. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011278009>

Aston, K. I., Uren, P. J., Jenkins, T. G., Horsager, A., Cairns, B. R., Smith, A. D., & Carrell, D. T. (2015). Aberrant sperm DNA methylation predicts male fertility status and embryo quality. *Fertility and Sterility*, 104(6), 1388-1397.e5. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.08.019>

Austin, C. R. (1952). The capacitation of the mammalian sperm. *Nature*, 170(4321), 326. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12993150>

Bahat, A., Caplan, S. R., & Eisenbach, M. (2012). Thermotaxis of human sperm cells in extraordinarily shallow temperature gradients over a wide range. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041915>

Bahat, A., & Eisenbach, M. (2010). Human Sperm Thermotaxis Is Mediated by Phospholipase C and Inositol Trisphosphate Receptor Ca<sup>2+</sup> Channel1. *Biology of Reproduction*, 82(3), 606–616. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080127>

Bahat, A., Eisenbach, M., & Tur-Kaspa, I. (2005). Periovulatory increase in temperature difference

within the rabbit oviduct. *Human Reproduction*, 20(8), 2118–2121.

<https://doi.org/10.1093/humrep/dei006>

Bahat, A., Tur-Kaspa, I., Gakamsky, A., Giojalas, L. C., Breitbart, H., & Eisenbach, M. (2003).

Thermotaxis of mammalian sperm cells: A potential navigation mechanism in the female genital tract. *Nature Medicine*, 9(2), 149–150. <https://doi.org/10.1038/nm0203-149>

Bahmanpour, S., Namavar, M. R., Talaei-Khozani, T., & Mazaheri, Z. (2012). The effect of the

follicular fluid on sperm chromatin quality in comparison with conventional media. In *European review for medical and pharmacological sciences*.

Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., & Forti, G. (2002). Signal transduction pathways in human spermatozoa. *Journal of Reproductive Immunology*, 53(1–2), 121–131.

[https://doi.org/10.1016/s0165-0378\(01\)00089-4](https://doi.org/10.1016/s0165-0378(01)00089-4)

Batista, C., van Lier, E., & Petrocelli, H. (2016). Dynamics of sperm DNA fragmentation in raw boar semen and fertility. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 51(5), 774–780.

<https://doi.org/10.1111/rda.12749>

Bender, A. T., & Beavo, J. A. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Molecular regulation to clinical use. In *Pharmacological Reviews* (Vol. 58, Issue 3, pp. 488–520).

<https://doi.org/10.1124/pr.58.3.5>

Bian, F., Mao, G., Guo, M., Mao, G., Wang, J., Li, J., Han, Y., Chen, X., Zhang, M., & Xia, G.

(2012). Gradients of natriuretic peptide precursor A (NPPA) in oviduct and of natriuretic peptide receptor 1 (NPR1) in spermatozoon are involved in mouse sperm chemotaxis and fertilization. *Journal of Cellular Physiology*, 227(5), 2230–2239.

<https://doi.org/10.1002/jcp.22962>

Boerke, A., Brouwers, J. F., Olkkonen, V. M., van de Lest, C. H. A., Sostaric, E., Schoevers, E. J.,

Helms, J. B., & Gadella, B. M. (2013). Involvement of Bicarbonate-Induced Radical Signaling

in Oxysterol Formation and Sterol Depletion of Capacitating Mammalian Sperm During In Vitro Fertilization. *Biology of Reproduction*, 88(1).

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.101253>

Bonet, S., & Molinas, M. (1986). Fagocitosis en los conductos eoididarios de dina lineata (Hirudinea, Erpobdellidae). In *SCIENTIA gerundensis* (Vol. 12).

Boryshpolets, S., Pérez-Cerezales, S., & Eisenbach, M. (2015). Behavioral mechanism of human sperm in thermotaxis: a role for hyperactivation. *Human Reproduction*, 30(4), 884–892.

<https://doi.org/10.1093/humrep/dev002>

Braude, P., Bolton, V., & Moore, S. (1988). Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*, 332(6163), 459–461.

<https://doi.org/10.1038/332459a0>

Breitbart, H. (2002). Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(1–2), 139–144. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00704-3](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00704-3)

Brenner, B. M., Ballermann, B. J., Gunning, M. E., & Zeidel, M. L. (1990). Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. In *Physiological Reviews* (Vol. 70, Issue 3, pp. 665–699). *Physiol Rev*. <https://doi.org/10.1152/physrev.1990.70.3.665>

Bridi, A., Perecin, F., & da Silveira, J. C. (2020). Extracellular vesicles mediated early embryo–maternal interactions. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21031163>

Brouwers, J. F., Boerke, A., Silva, P. F. N., Garcia-Gil, N., van Gestel, R. A., Helms, J. B., van de Lest, C. H. A., & Gadella, B. M. (2011). Mass Spectrometric Detection of Cholesterol Oxidation in Bovine Sperm. *Biology of Reproduction*, 85(1), 128–136.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.091207>

- Brown, S., Costello, S., Kelly, M., Ramalingan, M., Drew, E., Publicover, S., Barratt, C., & Martins Da Silva, S. (2017). Complex CatSper-dependent and independent  $[Ca^{2+}]_i$  signalling in human spermatozoa induced by follicular fluid. *Human Reproduction*, 32(10), 1995–2006. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex269>
- Brüssow, K. P., Rátky, J., & Rodriguez-Martinez, H. (2008). Fertilization and Early Embryonic Development in the Porcine Fallopian Tube. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(SUPPL.2), 245–251. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01169.x>
- Buck, J., & Levin, L. (2011). Physiological Sensing of Carbon Dioxide/Bicarbonate/pH via Cyclic Nucleotide Signaling. *Sensors*, 11(2), 2112–2128. <https://doi.org/10.3390/s110202112>
- Burden, H. P., Holmes, C. H., Persad, R., & Whittington, K. (2006). Prostasomes-their effects on human male reproduction and fertility. *Human Reproduction Update*, 12(3), 283–292. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi052>
- Burns, G., Brooks, K., Wildung, M., Navakanitworakul, R., Christenson, L. K., & Spencer, T. E. (2014). Extracellular vesicles in luminal fluid of the ovine uterus. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090913>
- Burns, G.W., Brooks, K. E., O’Neil, E. O., Hagen, D. E., Behura, S. K., & Spencer, T. E. (2018). Progesterone Effects on Extracellular Vesicles in the Sheep Uterus. *Biology of Reproduction*, 98(5). <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOY011>
- Burns, Gregory W., Brooks, K. E., & Spencer, T. E. (2016). Extracellular Vesicles Originate from the Conceptus and Uterus During Early Pregnancy in Sheep<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 94(3). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.134973>
- Calogero, A. E., Burrello, N., Palermo, I., Grasso, U., & D’Agata, R. (2000). Effects of progesterone on sperm function: mechanisms of action. *Human Reproduction (Oxford)*, 15, 28–45. [https://journals.indexcopernicus.com/publication/219558/A E-Calogero-Effects-of-](https://journals.indexcopernicus.com/publication/219558/A-E-Calogero-Effects-of-)

progesterone

- Carlson, A. E., Westenbroek, R. E., Quill, T., Ren, D., Clapham, D. E., Hille, B., Garbers, D. L., & Babcock, D. F. (2003). CatSper1 required for evoked Ca<sup>2+</sup> entry and control of flagellar function in sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(25), 14864–14868. <https://doi.org/10.1073/pnas.2536658100>
- Chan, S. Y. W., Fox, E. J., Chan, M. M. C., Tsoi, W. L., Wang, C., Tang, L. C., Tang, G. W., & Ho, P. C. (1985). The relationship between the human sperm hypoosmotic swelling test, routine semen analysis, and the human sperm zona-free hamster ovum penetration assay. *Fertility and Sterility*, 44(5), 668–672. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)48985-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)48985-5)
- Chávez, J. C., De la Vega-Beltrán, J. L., José, O., Torres, P., Nishigaki, T., Treviño, C. L., & Darszon, A. (2018). Acrosomal alkalization triggers Ca<sup>2+</sup> release and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Journal of Cellular Physiology*, 233(6), 4735–4747. <https://doi.org/10.1002/jcp.26262>
- Chen, Q., Yan, M., Cao, Z., Li, X., Zhang, Y., Shi, J., Feng, G. H., Peng, H., Zhang, X., Zhang, Y., Qian, J., Duan, E., Zhai, Q., & Zhou, Q. (2016). Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science*, 351(6271), 397–400. <https://doi.org/10.1126/science.aad7977>
- Cisneros-Mejorado, A., Hernández-Soberanis, L., Islas-Carbajal, M. C., & Sánchez, D. (2014). Capacitation and Ca<sup>2+</sup> influx in spermatozoa: Role of CNG channels and protein kinase G. *Andrology*, 2(1), 145–154. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00169.x>
- Cohen-Dayag, A., Ralt, D., Tur-Kaspa, I., Manor, M., Makler, A., Dor, J., Mashiach, S., & Eisenbach, M. (1994). Sequential Acquisition of Chemotactic Responsiveness by Human Spermatozoa1. *Biology of Reproduction*, 50(4), 786–790. <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.4.786>

- Cohen-Dayag, A., Tur-Kaspa, I., Dor, J., Mashiach, S., & Eisenbach, M. (1995). Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(24), 11039–11043. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.24.11039>
- Colaco, S., & Sakkas, D. (2018). Paternal factors contributing to embryo quality. In *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* (Vol. 35, Issue 11, pp. 1953–1968). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1304-4>
- Cometti, B., Dubey, R. K., Imthurn, B., Jackson, E. K., & Rosselli, M. (2003). Oviduct cells express the cyclic AMP-adenosine pathway. *Biology of Reproduction*, 69(3), 868–875. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.017962>
- Conti, M., & Beavo, J. (2007). Biochemistry and Physiology of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Essential Components in Cyclic Nucleotide Signaling. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), 481–511. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060305.150444>
- Cook, S. P., Brokaw, C. J., Muller, C. H., & Babcock, D. F. (1994). Sperm chemotaxis: egg peptides control cytosolic calcium to regulate flagellar responses. *Developmental Biology*, 165(1), 10–19. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1229>
- Coy, P., Lloyd, R., Romar, R., Satake, N., Matás, C., Gadea, J., & Holt, W. V. (2010). Effects of porcine pre-ovulatory oviductal fluid on boar sperm function. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.03.005>
- David, A., Vilensky, A., & Nathan, H. (1972). Temperature Changes in the Different Parts of the Rabbit's Oviduct. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 10(2), 52–56. <https://doi.org/10.1002/j.1879-3479.1972.tb00818.x>
- De Lamirande, E., Leclerc, P., & Gagnon, C. (1997). Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. In *Molecular Human Reproduction*

(Vol. 3, Issue 3).

Denissenko, P., Kantsler, V., Smith, D. J., & Kirkman-Brown, J. (2012). Human spermatozoa migration in microchannels reveals boundary-following navigation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(21), 8007–8010. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202934109>

Dominguez, E. M., Moreno-Irusta, A., Guidobaldi, H. A., Tribulo, H., & Giojalas, L. C. (2018). Improved bovine in vitro embryo production with sexed and unsexed sperm selected by chemotaxis. *Theriogenology*, 122, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.08.023>

Dubé, C., Tardif, S., Leclerc, P., & Bailey, J. L. (2003). The Importance of Calcium in the Appearance of p32, a Boar Sperm Tyrosine Phosphoprotein, During In Vitro Capacitation. *Journal of Andrology*, 24(5), 727–733. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02734.x>

Eisenbach, M. (1999). Sperm chemotaxis. *Reviews of Reproduction*, 4(1), 56–66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10051103>

Eisenbach, M. (2004). Towards understanding the molecular mechanism of sperm chemotaxis. *The Journal of General Physiology*, 124(2), 105–108. <https://doi.org/10.1085/jgp.200409142>

Eisenbach, M., & Giojalas, L. C. (2006). Sperm guidance in mammals - An unpaved road to the egg. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 7, Issue 4, pp. 276–285). *Nat Rev Mol Cell Biol*. <https://doi.org/10.1038/nrm1893>

El-Sherry, T. M., Elsayed, M., Abdelhafez, H. K., & Abdelgawad, M. (2014). Characterization of rheotaxis of bull sperm using microfluidics. *Integrative Biology (United Kingdom)*, 6(12), 1111–1121. <https://doi.org/10.1039/c4ib00196f>

Esbert, M., Pacheco, A., Vidal, F., Florensa, M., Riqueros, M., Ballesteros, A., Garrido, N., & Calderón, G. (2011). Impact of sperm DNA fragmentation on the outcome of IVF with own or donated oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*, 23(6), 704–710.

<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.07.010>

- Fabbri, R., Porcu, E., Lenzi, A., Gandini, L., Marsella, T., & Flamigni, C. (1998). Follicular fluid and human granulosa cell cultures: Influence on sperm kinetic parameters, hyperactivation, and acrosome reaction. *Fertility and Sterility*, 69(1), 112–117. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(97\)00421-4](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(97)00421-4)
- Fabro, G., Rovasio, R. A., Civalero, S., Frenkel, A., Caplan, S. R., Eisenbach, M., & Giojalas, L. C. (2002). Chemotaxis of capacitated rabbit spermatozoa to follicular fluid revealed by a novel directionality-based assay. *Biology of Reproduction*, 67(5), 1565–1571. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12390889>
- Fatehi, A. N., Bevers, M. M., Schoevers, E., Roelen, B. A. J., Colenbrander, B., & Gadella, B. M. (2006). DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *Journal of Andrology*, 27(2), 176–188. <https://doi.org/10.2164/jandrol.04152>
- Fléchon, J. E., & Hunter, R. H. F. (1981). Distribution of spermatozoa in the utero-tubal junction and isthmus of pigs, and their relationship with the luminal epithelium after mating: A scanning electron microscope study. *Tissue and Cell*, 13(1), 127–139. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(81\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0040-8166(81)90043-4)
- Flesch, F., Colenbrander, B., van Golde, L., & Gadella, B. (1999). Capacitation Induces Tyrosine Phosphorylation of Proteins in the Boar Sperm Plasma Membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 262(3), 787–792. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1300>
- Flesch, F. M., & Gadella, B. M. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1469(3), 197–235. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11063883>

- Florman, H. M., Corron, M. E., Kim, T. D. H., & Babcock, D. F. (1992). Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Developmental Biology*, 152(2), 304–314. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(92\)90137-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(92)90137-6)
- Fonteles, M. C., & Nascimento, N. R. F. (2011). Guanylin peptide family: history, interactions with ANP, and new pharmacological perspectives. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 89(8), 575–585. <https://doi.org/10.1139/y11-050>
- Franchi, A., Cubilla, M., Guidobaldi, H. A., Bravo, A., & Giojalas, L. C. (2016). Uterosome-like Vesicles Prompt Human Sperm Fertilizing Capability. *Molecular Human Reproduction*, 22(12). <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/GAW066>
- Franchi, A., Moreno-Irusta, A., Domínguez, E. M., Adre, A. J., & Giojalas, L. C. (2020). Extracellular vesicles from oviductal isthmus and ampulla stimulate the induced acrosome reaction and signaling events associated with capacitation in bovine spermatozoa. *Journal of Cellular Biochemistry*, 121(4), 2877–2888. <https://doi.org/10.1002/jcb.29522>
- Fraser, L. R. (2008). The role of small molecules in sperm capacitation. *Theriogenology*, 70(8), 1356–1359. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.016>
- Fukuda, N., Yomogida, K., Okabe, M., & Touhara, K. (2004). Functional characterization of a mouse testicular olfactory receptor and its role in chemosensing and in regulation of sperm motility. *Journal of Cell Science*, 117(24), 5835–5845. <https://doi.org/10.1242/jcs.01507>
- Funahashi, H. (2003). Polyspermic penetration in porcine IVM-IVF systems. In *Reproduction, Fertility and Development* (Vol. 15, Issues 3–4, pp. 167–177). <https://doi.org/10.1071/RD02076>
- Funahashi, H., Cantley, T. C., & Day, B. N. (1997). Synchronization of Meiosis in Porcine Oocytes by Exposure to Dibutyl Cyclic Adenosine Monophosphate Improves Developmental

Competence Following in Vitro Fertilization<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 57(1), 49–53.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod57.1.49>

Funahashi, H., & Day, B. N. (1993). Effects of different serum supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Theriogenology*, 39(4), 965–973.

[https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90433-6](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90433-6)

Gadella, B. M. (2017). Reproductive tract modifications of the boar sperm surface. *Molecular Reproduction and Development*, 84(9), 822–831. <https://doi.org/10.1002/mrd.22821>

Gadella, B. M., & Harrison, R. A. P. (2002). Capacitation Induces Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate-Dependent, but Apoptosis-Unrelated, Exposure of Aminophospholipids at the Apical Head Plasma Membrane of Boar Sperm Cells<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 67(1), 340–350. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.1.340>

Gagnon, C. (1990). *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*.

Gakamsky, A., Armon, L., & Eisenbach, M. (2009). Behavioral response of human spermatozoa to a concentration jump of chemoattractants or intracellular cyclic nucleotides.

<https://doi.org/10.1093/humrep/den409>

Galantino-Homer, H. L., Visconti, P. E., & Kopf, G. S. (1997). Regulation of Protein Tyrosine Phosphorylation during Bovine Sperm Capacitation by a Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate-Dependent Pathway<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 56(3), 707–719.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod56.3.707>

Galeati, G., Vallorani, C., Bucci, D., Bernardini, C., Tamanini, C., Parmeggiani, A., & Spinaci, M. (2010). Daidzein does affect progesterone secretion by pig cumulus cells but it does not impair oocytes IVM. *Theriogenology*, 74(3), 451–457.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.02.028>

Garbers, D. L., Chrisman, T. D., Wiegand, P., Katafuchi, T., Albanesi, J. P., Bielinski, V., Barylko,

- B., Redfield, M. M., & Burnett, J. C. (2006). Membrane guanylyl cyclase receptors: an update. In *Trends in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 17, Issue 6, pp. 251–258). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.06.006>
- Gatica, L. V., Guidobaldi, H. A., Montesinos, M. M., Teves, M. E., Moreno, A. I., Unates, D. R., Molina, R. I., & Giojalas, L. C. (2013). Picomolar gradients of progesterone select functional human sperm even in subfertile samples. *Molecular Human Reproduction*, 19(9), 559–569. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat037>
- Gil, P. I., Guidobaldi, H. A., Teves, M. E., Uñates, D. R., Sanchez, R., & Giojalas, L. C. (2008). Chemotactic response of frozen-thawed bovine spermatozoa towards follicular fluid. *Animal Reproduction Science*, 108(1–2), 236–246. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.08.006>
- Giojalas, L. C., & Rovasio, R. A. (1998). Mouse spermatozoa modify their motility parameters and chemotactic response to factors from the oocyte microenvironment. *International Journal of Andrology*, 21(4), 201–206. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.1998.00201.x>
- Gonçalves, R. F., Wolinetz, C. D., & Killian, G. J. (2007). Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins ( $\alpha V$  and  $\alpha 5$ ) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. *Theriogenology*, 67(3), 468–474. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.08.013>
- Gonzalez-Fernandez, L., Macias-Garcia, B., Loux, S. C., Varner, D. D., & Hinrichs, K. (2013). Focal Adhesion Kinases and Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinases Regulate Protein Tyrosine Phosphorylation in Stallion Sperm. *Biology of Reproduction*, 88(6), 138–138. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.107078>
- González-Fernández, L., Macías-García, B., Velez, I. C., Varner, D. D., & Hinrichs, K. (2012). Calcium-calmodulin and pH regulate protein tyrosine phosphorylation in stallion sperm. *Reproduction*, 144(4), 411–422. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0067>

- Greening, D. W., Nguyen, H. P. T., Elgass, K., Simpson, R. J., & Salamonsen, L. A. (2016). Human Endometrial Exosomes Contain Hormone-Specific Cargo Modulating Trophoblast Adhesive Capacity: Insights into Endometrial-Embryo Interactions<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 94(2). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.134890>
- Guidobaldi, H. A., Hirohashi, N., Cubilla, M., Buffone, M. G., & Giojalas, L. C. (2017). An intact acrosome is required for the chemotactic response to progesterone in mouse spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 84(4), 310–315. <https://doi.org/10.1002/mrd.22782>
- Guidobaldi, H. A., Teves, M. E., Uñates, D. F., Anastasia, A., & Giojalas, L. C. (2008). Progesterone from the cumulus cells is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus complex. *PLoS ONE*, 3(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003040>
- Guo, Y., Peng, D., Zhou, J., Lin, S., Wang, C., Ning, W., Xu, H., Deng, W., & Xue, Y. (2019). iEKPD 2.0: an update with rich annotations for eukaryotic protein kinases, protein phosphatases and proteins containing phosphoprotein-binding domains. *Nucleic Acids Research*, 47. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1063>
- Hansen, C., Srikanthakumar, A., & Downey, B. R. (1991). Presence of follicular fluid in the porcine oviduct and its contribution to the acrosome reaction. *Molecular Reproduction and Development*, 30(2), 148–153. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080300211>
- Harrison, R. A. P. (1996). Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reproduction, Fertility and Development*, 8(4), 581–594. <https://doi.org/10.1071/RD9960581>
- Holt, W. V., & Fazeli, A. (2015). Do sperm possess a molecular passport? Mechanistic insights into sperm selection in the female reproductive tract. *Molecular Human Reproduction*, 21(6). <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/GAV012>
- Holt, W. V., & Fazeli, A. (2016). Sperm Storage in the Female Reproductive Tract. *Annual Review*

of Animal Biosciences, 4(1), 291–310. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021815-111350>

Hong, C. Y., Chao, H. T., Lee, S. L., & Wei, Y. H. (1993). Modification of human sperm function by human follicular fluid: a review. *International Journal of Andrology*, 16(2), 93–96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1993.tb01160.x>

Hunter, R. H. F. (1984). Pre-ovulatory arrest and peri-ovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *Journal of Reproduction and Fertility*, 72(1), 203–211. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6471049>

Hunter, R. H. F. (2002). Vital aspects of Fallopian tube physiology in pigs. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 37(4), 186–190. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12173982>

Hunter, R. H. F. (2009). Temperature gradients in female reproductive tissues and their potential significance. In *Anim. Reprod.*, v (Vol. 6, Issue 1).

Hunter, R. H. F. (2012). Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biological Reviews*, 87(1), 244–255. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2011.00196.x>

Hunter, R. H. F., Cook, B., & Poyser, N. L. (1983). Regulation of oviduct function in pigs by local transfer of ovarian steroids and prostaglandins: a mechanism to influence sperm transport. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 14(4), 225–232. [https://doi.org/10.1016/0028-2243\(83\)90264-2](https://doi.org/10.1016/0028-2243(83)90264-2)

Hunter, R. H. F., & Nichol, R. (1986). A preovulatory temperature gradient between the isthmus and ampulla of pig oviducts during the phase of sperm storage. *Journal of Reproduction and Fertility*, 77(2), 599–606. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0770599>

Hunter, R. H. F., Petersen, H. H., & Greve, T. (1999). Ovarian follicular fluid, progesterone and Ca<sup>2+</sup> ion influences on sperm release from the Fallopian tube reservoir. *Molecular*

Reproduction and Development, 54(3), 283–291. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199911\)54:3<283::AID-MRD9>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199911)54:3<283::AID-MRD9>3.0.CO;2-T)

Ingermann, R. L., Holcomb, M., Robinson, M. L., & Cloud, J. G. (2002). Carbon dioxide and pH affect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Journal of Experimental Biology*, 205(18).

Isobe, T., Minoura, H., Tanaka, K., Shibahara, T., Hayashi, N., & Toyoda, N. (2002). The effect of Rantes on human sperm chemotaxis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 17(6), 1441–1446. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12042258>

Jaiswal, B. S., Tur-Kaspa, I., Dor, J., Mashiach, S., & Eisenbach, M. (1999). Human Sperm Chemotaxis: Is Progesterone a Chemoattractant?1. *Biology of Reproduction*, 60(6), 1314–1319. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.6.1314>

Janny, L., & Menezo, Y. J. R. (1994). Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. *Molecular Reproduction and Development*, 38(1), 36–42. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080380107>

Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., & Zaneveld, L. J. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70(1), 219–228. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219>

Kaláb, P., Pěkníková, J., Geussová, G., & Moos, J. (1998). Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway. *Molecular Reproduction and Development*, 51(3), 304–314. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199811\)51:3<304::AID-MRD10>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199811)51:3<304::AID-MRD10>3.0.CO;2-2)

Kantsler, V., Dunkel, J., Blayney, M., & Goldstein, R. E. (2014). Rheotaxis facilitates upstream navigation of mammalian sperm cells. *ELife*, 2014(3). <https://doi.org/10.7554/eLife.02403.001>

- Kaupp, U. B., Kashikar, N. D., & Weyand, I. (2008). Mechanisms of Sperm Chemotaxis. *Annual Review of Physiology*, 70(1), 93–117.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100654>
- Kaupp, U. B., Solzin, J., Hildebrand, E., Brown, J. E., Helbig, A., Hagen, V., Beyermann, M., Pampaloni, F., & Weyand, I. (2003). The signal flow and motor response controlling chemotaxis of sea urchin sperm. *Nature Cell Biology*, 5(2), 109–117.  
<https://doi.org/10.1038/ncb915>
- Khan, S., Amoyaw, K., Spudich, J. L., Reid, G. P., & Trentham, D. R. (1992). Bacterial chemoreceptor signaling probed by flash photorelease of a caged serine. *Biophysical Journal*, 62(1), 67–68. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(92\)81781-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(92)81781-2)
- Kim, S. H., Cho, K. W., Lim, S. H., Hwang, Y. H., Ryu, H., Oh, S. H., Seul, K. H., Jeong, G. B., & Yoon, S. (1992). Presence and release of immunoreactive atrial natriuretic peptide in granulosa cells of the pig ovarian follicle. *Regulatory Peptides*, 42(3), 153–162.  
[https://doi.org/10.1016/0167-0115\(92\)90095-C](https://doi.org/10.1016/0167-0115(92)90095-C)
- Knez, J., Kovačič, B., Vlaisavljević\*, V., & Vlaisavljević\*, V. (2013). Comparison of embryo transfer strategies and assisted reproduction outcome in Slovenian and cross-border patients.  
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.05.016>
- Kravets, F. G., Lee, J., Singh, B., Trocchia, A., Pentylala, S. N., & Khan, S. A. (2000). Prostatosomes: Current concepts. *The Prostate*, 43(3), 169–174. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0045\(20000515\)43:3<169::AID-PROS2>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0045(20000515)43:3<169::AID-PROS2>3.0.CO;2-D)
- Kurtz, A., Götz, K. H., Hamann, M., & Wagner, C. (1998). Stimulation of renin secretion by nitric oxide is mediated by phosphodiesterase 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(8), 4743–4747. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4743>
- Laurent, T. C., & Fraser, J. R. (1992). Hyaluronan. *FASEB Journal : Official Publication of the*

Federation of American Societies for Experimental Biology, 6(7), 2397–2404.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1563592>

Laurentino, S., Borgmann, J., & Gromoll, J. (2016). On the origin of sperm epigenetic heterogeneity. In *Reproduction* (Vol. 151, Issue 5, pp. R71–R78). BioScientifica Ltd.  
<https://doi.org/10.1530/REP-15-0436>

Lechniak, D., Kedzierski, A., & Stanislawski, D. (2002). The use of HOS test to evaluate membrane functionality of boar sperm capacitated in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, 37(6), 379–380. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2002.t01-1-00381.x>

Lee, S. L., Kuo, Y. M., Kao, C. C., Hong, C. Y., & Wei, Y. H. (1992). Purification of a sperm motility stimulator from porcine follicular fluid. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry And*, 101(4), 591–594. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(92\)90344-Q](https://doi.org/10.1016/0305-0491(92)90344-Q)

Leese, H. J. (1988). The formation and function of oviduct fluid. In *Journal of Reproduction and Fertility* (Vol. 82, Issue 2, pp. 843–856). *J Reprod Fertil*. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0820843>

Lefebvre, S., Hubert, B., Tekaia, F., Brahic, M., & Bureau, J. F. (1995). Isolation from Human Brain of Six Previously Unreported cDNAs Related to the Reverse Transcriptase of Human Endogenous Retroviruses. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 11(2), 231–237.  
<https://doi.org/10.1089/aid.1995.11.231>

Li, K., Li, R., Ni, Y., Sun, P., Liu, Y., Zhang, D., & Huang, H. (2018). Novel distance-progesterone-combined selection approach improves human sperm quality. *Journal of Translational Medicine*, 16(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1575-7>

Lishko, P. V., Botchkina, I. L., & Kirichok, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm. *Nature*, 471(7338), 387–391. <https://doi.org/10.1038/nature09767>

Lishko, P. V., & Kirichok, Y. (2010). The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. In *Journal of Physiology* (Vol. 588, Issue 23, pp. 4667–4672). *J Physiol*.

<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.194142>

Liu, W. M., Pang, R. T. K., Chiu, P. C. N., Wong, B. P. C., Lao, K., Lee, K. F., & Yeung, W. S. B.

(2012). Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(2),

490–494. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110368109>

López-Úbeda, R., García-Vázquez, F. A., Gadea, J., & Matás, C. (2017). Oviductal epithelial cells

selected boar sperm according to their functional characteristics. Asian Journal of Andrology,

18(4), 396. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.173936>

Luconi, M., Muratori, M., Forti, G., & Baldi, E. (1999). Identification and characterization of a

novel functional estrogen receptor on human sperm membrane that interferes with

progesterone effects. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 84(5), 1670–1678.

<https://doi.org/10.1210/jcem.84.5.5670>

Luño Lázaro, V., López-Úbeda, R., García-Vázquez, F. A., Gil, L., & Matás, C. (2013). Boar

Sperm tyrosine phosphorylation patterns in the presence of oviductal epithelial cells: In vitro,

ex vivo, and in vivo models. Reproduction, 146(4), 315–324. [https://doi.org/10.1530/REP-13-](https://doi.org/10.1530/REP-13-0159)

0159

Luño Lázaro, V., & Matás, C. (2012). Cambios en el espermatozoide desde la eyaculación hasta la

fecundación.

[http://axonveterinaria.net/web\\_axoncomunicacion/criaysalud/42/cys\\_42\\_espermatozoide\\_eyac-](http://axonveterinaria.net/web_axoncomunicacion/criaysalud/42/cys_42_espermatozoide_eyaculacion_hasta_fecundacion.pdf)

[ulacion\\_hasta\\_fecundacion.pdf](http://axonveterinaria.net/web_axoncomunicacion/criaysalud/42/cys_42_espermatozoide_eyaculacion_hasta_fecundacion.pdf)

Machado, S. A., Sharif, M., Wang, H., Bovin, N., & Miller, D. J. (2019). Release of Porcine Sperm

from Oviduct Cells is Stimulated by Progesterone and Requires CatSper. Scientific Reports,

9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55834-z>

Mannowetz, N., Miller, M. R., & Lishko, P. V. (2017). Regulation of the sperm calcium channel

CatSper by endogenous steroids and plant triterpenoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(22), 5743–5748.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1700367114>

Martin-DeLeon, P. A. (2016). Uterosomes: Exosomal cargo during the estrus cycle and interaction with sperm. *Frontiers in Bioscience - Scholar*, 8(1), 115–122. <https://doi.org/10.2741/S451>

Martinez, E. A., Vazquez, J. M., Matás, C., Gadea, J., Alonso, M. I., & Roca, J. (1996). Oocyte Penetration by Fresh or Stored Diluted Boar Spermatozoa before and after in Vitro Capacitation Treatments1. *Biology of Reproduction*, 55(1), 134–140.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod55.1.134>

Matás, C., Sansegundo, M., Ruiz, S., García-Vázquez, F. A., Gadea, J., Romar, R., & Coy, P. (2010). Sperm treatment affects capacitation parameters and penetration ability of ejaculated and epididymal boar spermatozoa. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.002>

Matás, C., Vieira, L., García-Vázquez, F. A., Avilés-López, K., López-Úbeda, R., Carvajal, J. A., & Gadea, J. (2011). Effects of centrifugation through three different discontinuous Percoll gradients on boar sperm function. *Animal Reproduction Science*, 127(1–2), 62–72.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.06.009>

Matsumoto, M., Solzin, J., Helbig, A., Hagen, V., Ueno, S., Kawase, O., Maruyama, Y., Ogiso, M., Godde, M., Minakata, H., Kaupp, U. B., Hoshi, M., & Weyand, I. (2003). A sperm-activating peptide controls a cGMP-signaling pathway in starfish sperm. *Developmental Biology*, 260(2), 314–324. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12921734>

Matthijs, A., Engel, B., & Woelders, H. (2003). Neutrophil recruitment and phagocytosis of boar spermatozoa after artificial insemination of sows, and the effects of inseminate volume, sperm dose and specific additives in the extender. In *Reproduction* (Vol. 125, Issue 3, pp. 357–367).

*Journals of Reproduction and Fertility Ltd.* <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250357>

- Mburu, J. N., Einarsson, S., Lundeheim, N., & Rodriguez-Martinez, H. (1996). Distribution, number and membrane integrity of spermatozoa in the pig oviduct in relation to spontaneous ovulation. *Animal Reproduction Science*, 45(1–2), 109–121. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(96\)01566-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(96)01566-7)
- Mburu, J. N., Rodriguez-Martinez, H., & Einarsson, S. (1997). Changes in sperm ultrastructure and localisation in the porcine oviduct around ovulation. *Animal Reproduction Science*, 47(1–2), 137–148. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(96\)01631-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(96)01631-4)
- Miki, K., & Clapham, D. E. (2013). Rheotaxis guides mammalian sperm. *Current Biology : CB*, 23(6), 443–452. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.02.007>
- Miller, M. R., Mannowetz, N., Iavarone, A. T., Safavi, R., Gracheva, E. O., Smith, J. F., Hill, R. Z., Bautista, D. M., Kirichok, Y., & Lishko, P. V. (2016). Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. *Science*, 352(6285), 555–559. <https://doi.org/10.1126/science.aad6887>
- Miraglia, E., Rullo, M. L., Bosia, A., Massobrio, M., Revelli, A., & Ghigo, D. (2007). Stimulation of the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate signaling pathway elicits human sperm chemotaxis in vitro. *Fertility and Sterility*, 87(5), 1059–1063. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.07.1540>
- Molina, L. C. P., Luque, G. M., Balestrini, P. A., Marín-Briggiler, C. I., Romarowski, A., & Buffone, M. G. (2018). Molecular basis of human sperm capacitation. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 6, p. 72). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00072>
- Muciaccia, B., Padula, F., Vicini, E., Gandini, L., Lenzi, A., & Stefanini, M. (2005). Beta-chemokine receptors 5 and 3 are expressed on the head region of human spermatozoon. *The FASEB Journal*, 19(14), 2048–2050. <https://doi.org/10.1096/fj.05-3962fje>

- Muratori, M., Marchiani, S., Tamburrino, L., Forti, G., Luconi, M., & Baldi, E. (2011). Markers of human sperm functions in the icsi era. *Frontiers in Bioscience*, 16(4), 1344–1363.  
<https://doi.org/10.2741/3793>
- Murdica, V., Giacomini, E., Makieva, S., Zarovni, N., Candiani, M., Salonia, A., Vago, R., & Viganò, P. (2020). In vitro cultured human endometrial cells release extracellular vesicles that can be uptaken by spermatozoa. *Scientific Reports*, 10(1), 8856.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-65517-9>
- Naz, R. K. (1999). Involvement of Protein Serine and Threonine Phosphorylation in Human Sperm Capacitation1. *Biology of Reproduction*, 60(6), 1402–1409.  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod60.6.1402>
- Naz, R. K., & Rajesh, P. B. (2004). Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. In *Reproductive Biology and Endocrinology (Vol. 2)*. *Reprod Biol Endocrinol*. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-75>
- Nguyen, H. P. T., Simpson, R. J., Salamonsen, L. A., & Greening, D. W. (2016). Extracellular Vesicles in the Intrauterine Environment: Challenges and Potential Functions. *Biology of Reproduction*, 95(5), 109–109. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.143503>
- Okamuras, N., Tajimas, Y., Soejimaj, A., Masudap, H., & Sugitas, Y. (1965). The journal of Biological Chemistry - Sodium Bicarbonate in Seminal Plasma Stimulates the Motility of Mammalian Spermatozoa through Direct Activation of Adenylate Cyclase\* (Vol. 260, Issue 17).
- Oliveira, R. G., Tomasi, L., Rovasio, R. A., & Giojalas, L. C. (1999). Increased velocity and induction of chemotactic response in mouse spermatozoa by follicular and oviductal fluids. *Journal of Reproduction and Fertility*, 115(1), 23–27. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1150023>
- Oren-Benaroya, R., Orvieto, R., Gakamsky, A., Pinchasov, M., & Eisenbach, M. (2008). The sperm

chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone.

<https://doi.org/10.1093/humrep/den265>

Osycka-Salut, C., Diez, F., Burdet, J., Gervasi, M., Franchi, A., Bianciotti, L., Davio, C., & Perez-Martinez, S. (2014). Cyclic AMP Efflux, via MRPs and A1 Adenosine Receptors, Is Critical for Bovine Sperm Capacitation. *Molecular Human Reproduction*, 20(1).

<https://doi.org/10.1093/MOLEHR/GAT053>

Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., & First, N. L. (1989). Capacitation of Bovine Sperm by Heparin: Inhibitory Effect of Glucose and Role of Intracellular pH1. *Biology of Reproduction*, 41(4), 683–699. <https://doi.org/10.1095/biolreprod41.4.683>

Patrat, C., Serres, C., & Jouannet, P. (2000). The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biology of the Cell*, 92(3–4), 255–266. [https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(00\)01072-8](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(00)01072-8)

Pérez-Cerezales, S., Boryshpolets, S., & Eisenbach, M. (2015). Behavioral mechanisms of mammalian sperm guidance. *Asian Journal of Andrology*, 17(4), 628–632.

<https://doi.org/10.4103/1008-682X.154308>

Pérez-Cerezales, S., Laguna-Barraza, R., De Castro, A. C., Sánchez-Calabuig, M. J., Cano-Oliva, E., De Castro-Pita, F. J., Montoro-Buils, L., Pericuesta, E., Fernández-González, R., & Gutiérrez-Adán, A. (2018). Sperm selection by thermotaxis improves ICSI outcome in mice. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21335-8>

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-21335-8>

Pérez-Cerezales, S., Ramos-Ibeas, P., Acuña, O., Avilés, M., Coy, P., Rizos, D., & Gutiérrez-Adán, A. (2018). The oviduct: from sperm selection to the epigenetic landscape of the embryo. *Biology of Reproduction*, 98(3). <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOX173>

Petters, R. M., & Wells, K. D. (1993). Culture of pig embryos. In *Journal of reproduction and fertility. Supplement* (Vol. 48, pp. 61–73). *J Reprod Fertil Suppl*.

Pichlo, M., Bungert-Plümke, S., Weyand, I., Seifert, R., Bönigk, W., Strünker, T., Kashikar, N. D.,

- Goodwin, N., Müller, A., Pelzer, P., Van, Q., Enderlein, J., Klemm, C., Krause, E., Trötschel, C., Poetsch, A., Kremmer, E., & Kaupp, U. B. (2014). High density and ligand affinity confer ultrasensitive signal detection by a guanylyl cyclase chemoreceptor. *Journal of Cell Biology*, 206(4), 541–557. <https://doi.org/10.1083/jcb.201402027>
- Pons-Rejraji, H., Artonne, C., Sion, B., Brugnon, F., Canis, M., Janny, L., & Grizard, G. (2011). Prostatomes: Inhibitors of capacitation and modulators of cellular signalling in human sperm. *International Journal of Andrology*, 34(6 PART 1), 568–580. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01116.x>
- Qi, H., Moran, M. M., Navarro, B., Chong, J. A., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Kirichok, Y., Ramsey, I. S., Quill, T. A., & Clapham, D. E. (2007). All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(4), 1219–1223. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610286104>
- Quintero Quinchia, Y. C., & Cardona Maya, W. D. (2017). Óxido nítrico y fertilidad masculina: relación directa con los parámetros seminales. In *Urología Colombiana* (Vol. 26, Issue 1, pp. 53–60). Elsevier Doyma. <https://doi.org/10.1016/j.uroco.2016.10.009>
- Ralt, D., Goldenberg, M., Fetterolfo, P., Thompson, D., Dort, J., Mashiach, S., Garbers § ¶, D. ., & Eisenbach, M. (1991). Sperm attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability (sperm-egg communication/follicular fluid/chemotaxis/sperm accumulation/fertilization). In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 88).
- Ralt, D., Manor, M., Cohen-Dayag, A., Tur-Kaspa, I., Ben-Shlomo, I., Makler, A., Yuli, I., Dor, J., Blumberg, S., & Mashiach, S. (1994). Chemotaxis and chemokinesis of human spermatozoa to follicular factors. *Biology of Reproduction*, 50(4), 774–785. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8199258>

- Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A. C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J. L., & Clapham, D. E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, 413(6856), 603–609. <https://doi.org/10.1038/35098027>
- Rennhack, A., Schiffer, C., Brenker, C., Fridman, D., Nitao, E. T., Cheng, Y. M., Tamburrino, L., Balbach, M., Stölting, G., Berger, T. K., Kierzek, M., Alvarez, L., Wachten, D., Zeng, X. H., Baldi, E., Publicover, S. J., Benjamin Kaupp, U., & Strünker, T. (2018). A novel cross-species inhibitor to study the function of CatSper Ca<sup>2+</sup> channels in sperm. *British Journal of Pharmacology*, 175(15), 3144–3161. <https://doi.org/10.1111/bph.14355>
- Revelli, A., Ghigo, D., Moffa, F., Massobrio, M., & Tur-Kaspa, I. (2002). Guanylate cyclase activity and sperm function. In *Endocrine Reviews* (Vol. 23, Issue 4, pp. 484–494). <https://doi.org/10.1210/er.2001-0020>
- Rodriguez-Martinez, H., Ekstedt, E., & Ridderstrale, Y. (1991). Histochemical localization of carbonic anhydrase in the female genitalia of pigs during the oestrous cycle. *Acta Anatomica*, 140(1), 41–47. <https://doi.org/10.1159/000147036>
- Rodríguez-Martínez, H., Saravia, F., Wallgren, M., Tienthai, P., Johannisson, A., Vázquez, J. M., Martínez, E., Roca, J., Sanz, L., & Calvete, J. J. (2005). Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*, 63(2), 514–535. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.028>
- Rodriguez-Martinez, H., Tienthai, P., Suzuki, K., Funahashi, H., Ekwall, H., A., O., Rodriguez-Martinez, H., Tienthai, P., Suzuki, K., Funahashi, H., Ekwall, H., & Johannisson, A. (2001). Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. *Reproduction* (Cambridge, England) Supplement. <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med4&AN=11980185>
- Romero-Aguirregomezcorta, J., Sugrue, E., Martínez-Fresneda, L., Newport, D., & Fair, S. (2018).

Hyperactivated stallion spermatozoa fail to exhibit a rheotaxis-like behaviour, unlike other species. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34973-9>

Ronquist, G., & Brody, I. (1985). The prostasome: its secretion and function in man. In *BBA - Reviews on Biomembranes* (Vol. 822, Issue 2, pp. 203–218). *Biochim Biophys Acta*. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(85\)90008-5](https://doi.org/10.1016/0304-4157(85)90008-5)

Ruskoaho, H. (1992). Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism. *Pharmacological Reviews*, 44(4).

Sakkas, D., Ramalingam, M., Garrido, N., & Barratt, C. L. R. (2015). Sperm selection in natural conception: what can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes? *Human Reproduction Update*, 21(6), 711–726. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv042>

Salehi, M., Afarinesh, M. reza, Haghpanah, T., Ghaffari Novin, M., & Farifteh, F. (2019). Impact of sperm DNA fragmentation on ICSI outcome and incidence of apoptosis of human pre-implantation embryos obtained from in vitro matured MII oocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 510(1), 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.01.056>

Schall, T. J., Bacon, K., Toy, K. J., & Goeddel, D. V. (1990). Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature*, 347(6294), 669–671. <https://doi.org/10.1038/347669a0>

Seifert, R., Flick, M., Bönigk, W., Alvarez, L., Trötschel, C., Poetsch, A., Müller, A., Goodwin, N., Pelzer, P., Kashikar, N. D., Kremmer, E., Jikeli, J., Timmermann, B., Kuhl, H., Fridman, D., Windler, F., Kaupp, U. B., & Strünker, T. (2015). The CatSper channel controls chemosensation in sea urchin sperm. *The EMBO Journal*, 34(3), 379–392. <https://doi.org/10.15252/embj.201489376>

- Senger, P. L. (1999). *Pathways to Pregnancy and Parturition* (1st.). Washington State University Research & Technology Park. 1615NE Eastgate Blvd Pullman, Wa 99163- 5607.
- Serrano, H., Canchola, E., & García-Suárez, M. D. (2001). Sperm-attracting activity in follicular fluid associated to an 8.6-kDa protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 283(4), 782–784. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4861>
- Shoukir, Y., Chardonens, D., Campana, A., & Sakkas, D. (1998). Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: A paternal influence? *Human Reproduction*, 13(6), 1632–1637. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.6.1632>
- Shuang-Lin, L., Chin-Cheng, K., & Yau-Huei, W. (1994). Antithrombin III enhances the motility and chemotaxis of boar sperm. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, 107(2), 277–282. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(94\)90381-6](https://doi.org/10.1016/0300-9629(94)90381-6)
- Signorelli, J. R., Díaz, E. S., Fara, K., Barón, L., & Morales, P. (2013). Protein phosphatases decrease their activity during capacitation: A new requirement for this event. *PLoS ONE*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081286>
- Silvestroni, L., Palleschi, S., Guglielmi, R., & Croce, C. T. (1992). Identification and localization of atrial natriuretic factor receptors in human spermatozoa. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 28(2), 75–82. <https://doi.org/10.3109/01485019208987683>
- Simons, J., Olson, S., Cortez, R., & Fauci, L. (2014). The dynamics of sperm detachment from epithelium in a coupled fluid-biochemical model of hyperactivated motility. *Journal of Theoretical Biology*, 354, 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2014.03.024>
- Sindić, A., & Schlatter, E. (2006). Mechanisms of action of uroguanylin and guanylin and their role in salt handling. In *Nephrology Dialysis Transplantation* (Vol. 21, Issue 11, pp. 3007–3012). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfl314>
- Soriano-Úbeda, C., García-Vázquez, F. A., Romero-Aguirregomezcorta, J., & Matás, C. (2017).

Improving porcine in vitro fertilization output by simulating the oviductal environment.

Scientific Reports, 7(1), 43616. <https://doi.org/10.1038/srep43616>

Spehr, M., Gisselmann, G., Poplawski, A., Riffell, J. A., Wetzel, C. H., Zimmer, R. K., & Hatt, H.

(2003). Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis.

Science, 299(5615), 2054–2058. <https://doi.org/10.1126/science.1080376>

Spehr, M., Schwane, K., Riffell, J. A., Barbour, J., Zimmer, R. K., Neuhaus, E. M., & Hatt, H.

(2004). Particulate Adenylate Cyclase Plays a Key Role in Human Sperm Olfactory Receptor-mediated Chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(38), 40194–40203.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M403913200>

Spencer, T. E., & Bazer, F. W. (2002). Biology of progesterone action during pregnancy

recognition and maintenance of pregnancy. In *Frontiers in bioscience : a journal and virtual*

*library* (Vol. 7). *Front Biosci*. <https://doi.org/10.2741/spencer>

Staicu, F. D., & Matás, C. (2017). Nitric Oxide: Key Features in Spermatozoa. In *Nitric Oxide*

*Synthase - Simple Enzyme-Complex Roles*. InTech. <https://doi.org/10.5772/67551>

Suarez, S. S., & Pacey, A. A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Human*

*Reproduction Update*, 12(1), 23–37. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi047>

Sun, F., Bahat, A., Gakamsky, A., Girsh, E., Katz, N., Giojalas, L. C., Tur-Kaspa, I., & Eisenbach,

M. (2005). Human sperm chemotaxis: both the oocyte and its surrounding cumulus cells

secrete sperm chemoattractants. *Human Reproduction*, 20(3), 761–767.

<https://doi.org/10.1093/humrep/deh657>

Sun, F., Giojalas, L. C., Rovasio, R. A., Tur-Kaspa, I., Sanchez, R., & Eisenbach, M. (2003). Lack

of species-specificity in mammalian sperm chemotaxis. *Developmental Biology*, 255(2), 423–

427. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(02\)00090-8](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(02)00090-8)

Sundsford, J. A., Forsdahl, F., & Thibault, G. (1989). Physiological levels of immunoreactive

ANH-like peptides in human follicular fluid. *Acta Endocrinologica*, 121(4), 578–580.

<https://doi.org/10.1530/acta.0.1210578>

Suzuki, K., Asano, A., Eriksson, B., Niwa, K., Nagai, T., & Rodriguez-Martinez, H. (2002).

Capacitation status and in vitro fertility of boar spermatozoa: Effects of seminal plasma, cumulus-oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan. *International Journal of Andrology*, 25(2), 84–93. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.2002.00330.x>

Talevi, R., & Gualtieri, R. (2010). Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release. In *Theriogenology* (Vol. 73, Issue 6, pp. 796–801). *Theriogenology*.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.07.005>

Tanii, I., Aradate, T., Matsuda, K., Komiya, A., & Fuse, H. (2011). PACAP-mediated sperm-cumulus cell interaction promotes fertilization. *Reproduction*, 141(2), 163–171.

<https://doi.org/10.1530/REP-10-0201>

Tardif, S., Dubé, C., Chevalier, S., & Bailey, J. L. (2001). Capacitation Is Associated with Tyrosine Phosphorylation and Tyrosine Kinase-Like Activity of Pig Sperm Proteins1. *Biology of Reproduction*, 65(3), 784–792. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.3.784>

Teves, M. E., Barbano, F., Guidobaldi, H. A., Sanchez, R., Miska, W., & Giojalas, L. C. (2006).

Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 86(3), 745–749. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.02.080>

Teves, M. E., Guidobaldi, H. A., Uñates, D. R., Sanchez, R., Miska, W., Publicover, S. J., Garcia, A. A. M., & Giojalas, L. (2009). Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone. *PLoS ONE*, 4(12), e8211. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008211>

Tienthai, P. (2015). The porcine sperm reservoir in relation to the function of hyaluronan. In *Journal of Reproduction and Development* (Vol. 61, Issue 4, pp. 245–250). The Japanese Society of Animal Reproduction (JSAR). <https://doi.org/10.1262/jrd.2015-006>

- Tienthai, P., Johannisson, A., & Rodriguez-Martinez, H. (2004). Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Animal Reproduction Science*, 80(1–2), 131–146. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00134-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00134-9)
- Toole, B. P. (2002). Hyaluronan promotes the malignant phenotype. In *Glycobiology* (Vol. 12, Issue 3). <http://www.glycoforum.gr.jp>
- Töpfer-Petersen, E., Wagner, A., Friedrich, J., Petrunkina, A., Ekhlesi-Hundrieser, M., Waberski, D., & Drommer, W. (2002). Function of the mammalian oviductal sperm reservoir. *Journal of Experimental Zoology*, 292(2), 210–215. <https://doi.org/10.1002/jez.1157>
- Tornell, J., Carlsson, B., & Billig, H. (1990). Atrial natriuretic peptide inhibits spontaneous rat oocyte maturation. *Endocrinology*, 126(3), 1504–1508. <https://doi.org/10.1210/endo-126-3-1504>
- Trebichalská, Z., & Holubcová, Z. (2020). Perfect date—the review of current research into molecular bases of mammalian fertilization. In *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* (pp. 1–14). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01679-4>
- Trötschel, C., Hamzeh, H., Alvarez, L., Pascal, R., Lavryk, F., Bönigk, W., Körschen, H. G., Müller, A., Poetsch, A., Rennhack, A., Gui, L., Nicastro, D., Strünker, T., Seifert, R., & Kaupp, U. B. (2020). Absolute proteomic quantification reveals design principles of sperm flagellar chemosensation. *The EMBO Journal*, 39(4). <https://doi.org/10.15252/emj.2019102723>
- Utleg, A. G., Yi, E. C., Xie, T., Shannon, P., White, J. T., Goodlett, D. R., Hood, L., & Lin, B. (2003). Proteomic analysis of human prostasomes. *Prostate*, 56(2), 150–161. <https://doi.org/10.1002/pros.10255>
- Vadnais, M. L., Galantino-Homer, H. L., & Althouse, G. C. (2007). Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation. In *Archives of Andrology* (Vol.

53, Issue 3, pp. 109–123). <https://doi.org/10.1080/01485010701329386>

Vicente-Carrillo, A., Álvarez-Rodríguez, M., & Rodríguez-Martínez, H. (2017). The CatSper channel modulates boar sperm motility during capacitation. *Reproductive Biology*, 17(1), 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2017.01.001>

Villanueva-Díaz, C., Vadillo-Ortega, F., Kably-Ambe, A., Díaz-Pérez, M. D. L. A., & Krivitzky, S. K. (1990). Evidence that human follicular fluid contains a chemoattractant for spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 54(6), 1180–1182. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)54027-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)54027-8)

Visconti, P. E. (2009). Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0811895106](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0811895106)

Visconti, P. E., Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D., Olds-Clarke, P., & Kopf, G. S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, 121(4), 1129–1137.

Visconti, P. E., Galantino-Homer, H., Moore, G. D., Bailey, J. L., Ning, X., Fornes, M., & Kopf, G. S. (1998). The molecular basis of sperm capacitation. In *Journal of Andrology* (Vol. 19, Issue 2, pp. 242–248). <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1998.tb01994.x>

Visconti, P. E., & Kopf, G. S. (1998). Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biology of Reproduction*, 59(1), 1–6. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.1.1>

Visconti, P. E., Moore, G. D., Bailey, J. L., Leclerc, P., Connors, S. A., Pan, D., Olds-Clarke, P., & Kopf, G. S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*, 121(4), 1139–1150.

Visconti, P. E., Ning, X. P., Fornés, M. W., Alvarez, J. G., Stein, P., Connors, S. A., & Kopf, G. S. (1999). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: Cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm

capacitation. *Developmental Biology*, 214(2), 429–443.

<https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9428>

Vredenburg-Wilberg, W. L., & Parrish, J. J. (1995). Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Molecular Reproduction and Development*, 40(4), 490–502.

<https://doi.org/10.1002/mrd.1080400413>

Walensky, L. D., Roskams, A. J., Lefkowitz, R. J., Snyder, S. H., & Ronnett, G. V. (1995). Odorant receptors and desensitization proteins colocalize in mammalian sperm. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 1(2), 130–141. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8529092>

Wang, Y., Storeng, R., Dale, P. O., Åbyholm, T., & Tanbo, T. (2001). Effects of follicular fluid and steroid hormones on chemotaxis and motility of human spermatozoa in vitro. *Gynecological Endocrinology*, 15(4), 286–292. <https://doi.org/10.1080/gye.15.4.286.292>

Wennemuth, G., Carlson, A. E., Harper, A. J., & Babcock, D. F. (2003). Bicarbonate actions on flagellar and Ca<sup>2+</sup>-channel responses: Initial events in sperm activation. In *Development (Vol. 130, Issue 7, pp. 1317–1326)*. <https://doi.org/10.1242/dev.00353>

Yanagimachi, R. (1984). Fertilization in mammals. *The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 9(2), 81–85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6535310>

Zamir, N., Riven-Kreitman, R., Manor, M., Makler, A., Blumberg, S., Ralt, D., & Eisenbach, M. (1993). Atrial natriuretic peptide attracts human spermatozoa in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 197(1), 116–122.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8250915>

Zapata-Carmona, H., Soriano-Úbeda, C., París-Oller, E., & Matás, C. (2019). Perioovulatory oviductal fluid decreases sperm protein kinase A activity, tyrosine phosphorylation, and in vitro fertilization in pig. *Andrology*, andr.12751. <https://doi.org/10.1111/andr.12751>

Zeng, Y., Oberdorf, J. A., & Florman, H. M. (1996). pH regulation in mouse sperm: Identification

of Na<sup>+</sup>-, Cl<sup>-</sup>-, and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Developmental Biology*, 173(2), 510–520. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0044>

Zhang, Z., Liu, J., Meriano, J., Ru, C., Xie, S., Luo, J., & Sun, Y. (2016). Human sperm rheotaxis: A passive physical process. *Scientific Reports*, 6(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep23553>

Zhou, C. X., Wang, X. F., & Chan, H. C. (2005). Bicarbonate secretion by the female reproductive tract and its impact on sperm fertilizing capacity. In *Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]* (Vol. 57, Issue 2, pp. 115–124).