



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza



ESTUDIO DE LA QUIMIOTAXIS ESPERMÁTICA UTILIZANDO DIFERENTES DISPOSITIVOS

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Autora:

Virginia Portolés Bayod

Directoras:

Rosaura Pérez Pé

Sara Miguel Jiménez

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Grado en Biotecnología

Septiembre 2019



La Dra. Rosaura Pérez Pé, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza y, Sara Miguel Jiménez, Investigadora Predoctoral del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza

INFORMAN:

Que la alumna Dña. Virginia Portolés Bayod, ha realizado bajo nuestra dirección, en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, su Trabajo Fin de Grado titulado “Estudio de la quimiotaxis espermática utilizando diferentes dispositivos”. Este trabajo cumple los objetivos recogidos en las Directrices TFG en Biotecnología, por lo que se considera procedente su presentación.

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos la presente en Zaragoza a 10 de Septiembre de 2019.

Rosaura Pérez Pé

Sara Miguel Jiménez

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Capacitación espermática	3
2.2. Hiperactivación.....	3
2.3. Orientación espermática y quimiotaxis	4
2.4. Hormonas presentes en el tracto reproductor femenino.....	4
2.5. Métodos de estudio de la quimiotaxis.....	6
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS	10
4.1. Obtención de las muestras seminales.....	10
4.2. Selección espermática por el método <i>swim-up</i> /dextrano.....	10
4.3. Cálculo de la concentración espermática	10
4.4. Inducción de la capacitación <i>in vitro</i>	11
4.5. Evaluación de las muestras espermáticas.....	11
4.5.1. Análisis de la motilidad espermática.....	11
4.5.2. Evaluación de la integridad de la membrana plasmática: viabilidad	11
4.6. Determinación del estado de capacitación: tinción con clorotetraciclina	12
4.7. Estudio de la posible quimiotaxis espermática producida por progesterona, estradiol y melatonina	13
4.8. Análisis estadísticos.....	14
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
5.1. Ensayos de quimiotaxis utilizando la cámara Dunn	15
5.1.1. Análisis del estado de las muestras espermáticas	15
5.1.2. Estudio del posible efecto quimiotáctico de la progesterona, el estradiol y la melatonina sobre los espermatozoides ovinos utilizando la cámara Dunn.....	17
5.1.2.1. Análisis del índice quimiotáctico (<i>Ch index</i>).....	17
5.2. Ensayos de quimiotaxis utilizando la cámara Ibidi.....	17
5.2.1. Análisis del estado de las muestras espermáticas	17
5.2.2. Estudio del posible efecto quimiotáctico de la progesterona, el estradiol y la melatonina sobre los espermatozoides ovinos utilizando la cámara Ibidi	19
5.2.2.1. Análisis del índice quimiotáctico (<i>Ch index</i>).....	19
6. CONCLUSIONES	21
CONCLUSIONS	21
7. BIBLIOGRAFÍA	22

1. RESUMEN

La progesterona, el estradiol y la melatonina son hormonas secretadas por las células del cumulus que rodean al ovocito y, están presentes en el fluido folicular, estableciendo un gradiente de concentración desde las proximidades del ovocito hasta regiones más distales del tracto reproductor femenino. Esto podría dar lugar a una respuesta quimiotáctica, que guiaría al espermatozoide hasta el ovocito para fecundarlo. Los espermatozoides de mamíferos poseen receptores de membrana para las tres hormonas mencionadas, y las tres se han relacionado con el proceso de capacitación espermática previo a la fecundación.

Se ha descrito que la progesterona actúa como quimioatrayente para espermatozoides humanos y de conejo, y que la melatonina provoca quimiotaxis en células tumorales y somáticas. Por ahora no hay estudios acerca del papel quimiotáctico de estas hormonas en espermatozoides ovinos, por lo que su estudio constituyó el objetivo principal de este trabajo.

Se evaluó la respuesta quimiotáctica frente a dichas hormonas a diferentes concentraciones (100 pM y 1 μ M) tanto en espermatozoides seleccionados por *swim up* (sin capacitar) como en espermatozoides capacitados *in vitro* (sin y con agentes elevadores del AMPc (*cocktail*)). Se utilizaron dos cámaras de estudio de quimiotaxis (Dunn e Ibidi) y, para el análisis, un software desarrollado por el grupo (OpenCASA) que proporciona un índice quimiotáctico.

Los resultados obtenidos mostrarían una cierta capacidad quimiotáctica de la progesterona y la melatonina sobre espermatozoides ovinos capacitados *in vitro* a las dosis ensayadas, ya que el índice quimiotáctico aumentó significativamente para ambas hormonas. Sin embargo, el estradiol no mostró ninguna acción quimioatrayente. Además, los resultados sugieren que la cámara Ibidi es más apropiada que la cámara Dunn para el estudio de la quimiotaxis en espermatozoides ovinos y que sólo los espermatozoides capacitados son capaces de responder al estímulo quimiotáctico.

ABSTRACT

Progesterone, estradiol and melatonin are hormones secreted by the cumulus cells that surround the oocyte and are also found in the follicular fluid in ovine species, establishing a concentration gradient from the vicinity of the oocyte to more distal regions of the female reproductive tract. This could result in a chemotactic response which would guide the sperm to the oocyte for fertilization. In addition, ram sperm have membrane receptors for the three mentioned hormones, so they could be involved in the process of ram sperm capacitation prior to fertilization.

Progesterone is known to act as a chemoattractant for human and rabbit sperm and melatonin produces chemotaxis in tumoral and somatic cells. Until now, there are no studies about the chemotactic role of these three hormones for ram sperm, so their study was the main objective of this job.

The chemotactic response to these hormones was evaluated at different concentrations (100 pM and 1 μ M) in spermatozoa selected by *swim up* (no capacitated) and in spermatozoa capacitated *in vitro* (without and with cAMP-elevating agents (*cocktail*)). Two chemotaxis study chambers were used for this purpose (Dunn and Ibidi) and, for the analysis, a specific software developed by the group was used (OpenCASA) giving a chemotaxis index.

The results obtained would show a certain chemotactic effect of progesterone and melatonin on ram sperm capacitated *in vitro* for both assayed concentrations, since a statistically significant increase in the chemotactic index was observed. However, estradiol did not show chemoattractant action. Moreover, the Ibidi chamber is more suitable for chemotaxis studies and only capacitated sperm are able to respond to chemotactic stimulus.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Capacitación espermática

Los espermatozoides formados tras el proceso de espermatogénesis parecen maduros desde un punto de vista morfológico, pero no han adquirido motilidad progresiva ni la capacidad de fecundar un ovocito. Durante el tránsito epididimal los espermatozoides adquieren motilidad, pero la capacidad fecundante *in vivo* solo la obtienen durante su tránsito por el tracto reproductor femenino. El conjunto de eventos moleculares y fisiológicos que confieren a los espermatozoides la capacidad de fecundar se conoce como capacitación. Estos eventos conllevan cambios en la membrana plasmática del espermatozoide (1), movimientos de calcio intracelular (2) y una serie de cascadas de transducción de señales bioquímicas (3). Sólo los espermatozoides capacitados, los cuales comprenden aproximadamente un 10 % del total, pueden llegar a experimentar la reacción acrosómica, un proceso de excitosis controlada que ayuda al espermatozoide a penetrar en la zona pelúcida del ovocito y por tanto poder realizar la fecundación con éxito (4).

La capacitación también se correlaciona con cambios en los patrones de motilidad de los espermatozoides, designados como hiperactivación espermática (5), si bien algunos autores lo describen como un proceso independiente de la capacitación (6). Para comprender el proceso de capacitación a nivel molecular se han de considerar los eventos que ocurren tanto en la cabeza del espermatozoide (reacción acrosómica) como en el flagelo (cambios de motilidad).

El oviducto o el útero representan los sitios fisiológicos de la capacitación *in vivo* en muchas especies (7). Sin embargo, la capacitación puede realizarse *in vitro* en numerosas especies incubando espermatozoides eyaculados en medios definidos que imitan la composición del fluido oviductal. En la mayoría de los casos, estos medios poseen sustratos, tales como piruvato, lactato y glucosa (dependiendo la especie), una fuente de proteína (generalmente albúmina sérica), NaHCO_3 y calcio. La albúmina sérica, presente en dichos medios, funciona durante la capacitación *in vitro* como aceptor de colesterol para facilitar su eliminación de las membranas plasmáticas de los espermatozoides, lo que produce cambios en la fluidez de la membrana (8). El calcio y el bicarbonato también están implicados en el proceso de capacitación, ya que su aumento en el interior del espermatozoide permite activar la adenilato ciclasa soluble para producir AMP cíclico (AMPC), que activa la proteína quinasa A (PKA). Esta proteína, a su vez, activa protein tirosin quinazas e inhibe a las protein tirosin fosfatasa. De esta manera se fosforilan residuos de tirosina de proteínas de la membrana plasmática del espermatozoide, tanto en la cabeza como en el flagelo (9). Este cambio da lugar a un aumento en la flexibilidad o elasticidad de las proteínas por lo que se aumenta la motilidad del flagelo, dando lugar al mencionado proceso de hiperactivación de la motilidad (10).

2.2. Hiperactivación

La hiperactivación espermática, por tanto, es un cambio en el patrón de movimiento de los espermatozoides de mamíferos en el oviducto, el cual es esencial para la fecundación. Los espermatozoides hiperactivados tienen capacidad para liberarse del reservorio oviductal donde se almacenan ya que se adhieren al epitelio del oviducto. Además, este evento proporciona a los espermatozoides una mayor fuerza para nadar a través de sustancias viscosas en el oviducto y de la matriz de las células del *cumulus oophorus* del ovocito. Por otra parte, los espermatozoides requieren esta hiperactivación para penetrar en la zona pelúcida del ovocito, pudiendo alcanzar su membrana plasmática y fusionarse con ella (11).

El movimiento del espermatozoide no va a ser igual antes y después de la capacitación. Al entrar en el tracto reproductor femenino, la trayectoria de la célula es rectilínea y permite su avance, debido a la alta frecuencia y baja amplitud del movimiento oscilatorio del flagelo (motilidad progresiva). Tras la capacitación, se produce la hiperactivación, la cual se caracteriza por una alta amplitud asimétrica y una baja frecuencia del movimiento oscilatorio del flagelo. Estos cambios en el patrón de motilidad post-capacitación van a permitir encontrar al ovocito y atravesar sus envolturas.

2.3. Orientación espermática y quimiotaxis

En mamíferos, la orientación espermática en el oviducto parece esencial para la llegada al ovocito. Los espermatozoides, una vez están en el tracto reproductor femenino, necesitan superar ciertas estructuras anatómicas y avanzar en la dirección correcta para poder llegar al lugar donde se produce la fecundación. Por ello, parece lógico que existan mecanismos que guíen a los espermatozoides hasta las proximidades del ovocito (12). Han sido propuestos tres mecanismos diferentes de orientación espermática: termotaxis, reotaxis y quimiotaxis. Cada uno de ellos responde ante un estímulo diferente: gradiente de temperatura, flujo de fluido y gradiente de concentración de un quimioatrayente, respectivamente. Existen similitudes entre dichos mecanismos como el hecho de ser efectivos solamente en espermatozoides capacitados y la necesidad de adquirir un movimiento de hiperactivación en los tres casos (13).

La **quimiotaxis espermática** es un mecanismo por el cual el espermatozoide es guiado hasta la superficie del ovocito gracias a un gradiente de concentración de un atrayente químico. A diferencia de los animales de fecundación externa, donde está ampliamente demostrada y se conocen con exactitud los agentes quimioatrayentes, los receptores en el espermatozoide, y las vías de señalización (14), la quimiotaxis en mamíferos todavía presenta multitud de incógnitas. Aunque mencionada por primera vez en 1958 (15), no se publicaron más estudios hasta principios de los años noventa. El ovocito y las células del cumulus que lo recubren liberan sustancias químicas que pueden estar presentes en el fluido folicular y que han sido postuladas como quimioatrayentes espermáticos (16), como la progesterona (17), el péptido natriurético atrial (18) y la quimiocina RANTES (19).

La relación entre quimiotaxis e hiperactivación es desconocida. *In vivo*, los espermatozoides se hiperactivan en el oviducto, lejos del complejo cumulus-ovocito y posiblemente más allá de la influencia de los gradientes quimiotácticos que emanan del ovocito o de las células del cumulus. De esta manera, es probable que los espermatozoides estén hiperactivados antes de detectar gradientes quimiotácticos (13).

El estudio de la quimiotaxis en mamíferos resulta complicado por varios motivos: 1) Sólo la pequeña fracción de espermatozoides capacitados muestra respuesta quimiotáctica, por lo cual la relación señal/ruido en los ensayos de comportamiento espermático es baja (14). 2) Muchas de las moléculas implicadas en quimiotaxis, como progesterona, AMPc y Ca²⁺, también están involucradas en la capacitación, la hiperactivación y la reacción acrosómica. 3) No existen dispositivos y/o sistemas de análisis específicos para ello.

2.4. Hormonas presentes en el tracto reproductor femenino

a. Progesterona y estradiol

Las hormonas esteroideas, como la progesterona y el estradiol, juegan un papel fundamental en la regulación de los procesos reproductivos de los mamíferos a través del eje hipotalámico-hipofisario-

gonadal. Dichas hormonas regulan la expresión génica gracias a la existencia de receptores nucleares para ellas en las células. Pero además ambas pueden actuar de manera no-genómica en varios tipos celulares, afectando a rutas de transducción de señales, y dando lugar a distintas respuestas en un corto intervalo de tiempo. Tanto la progesterona como el estradiol se encuentran en el tracto reproductor femenino, concretamente en el fluido folicular y en las cercanías del ovocito a concentraciones micromolares (20). Son secretadas por las células del cumulus que rodean el ovocito. Se han descubierto receptores específicos para progesterona y estradiol en la membrana plasmática de espermatozoides humanos, porcinos y equinos (21-23), entre otras especies, que podrían regular las acciones de estas hormonas esteroideas. Nuestro grupo identificó, por primera vez, los receptores de progesterona, y los de estrógeno, tanto α como β , en la membrana espermática del espermatozoide ovino (24).

Ya que los procesos de capacitación, hiperactivación y reacción acrosómica se llevan a cabo en el tracto reproductor femenino, donde se encuentran estas hormonas, y que los espermatozoides poseen receptores específicos para ellas, se postula que tanto la progesterona como el estradiol, podrían tener una función importante en su modulación. Así, se ha descrito que la progesterona activa varias rutas de señalización importantes en la regulación de la capacitación, la hiperactivación y la quimiotaxis espermática, como la generación de AMPc, el incremento de calcio intracelular por apertura de un canal de Ca^{2+} específico, la fosforilación de residuos de tirosina en proteínas...

Se ha visto que la distribución radial de las células del cumulus permite que se forme un gradiente de progesterona desde el centro a la periferia de la masa de dichas células. Se podría decir que los niveles bajos de progesterona que existen en la periferia de las células del cumulus producen quimiotaxis, mientras que los niveles más altos de progesterona en el interior de la masa de células del cumulus podrían inducir reacciones acrosómicas (17). En cuanto a su acción quimiotáctica, sólo se ha demostrado en humano y conejo, a concentraciones que van desde picomolares hasta micromolares (17), si bien los mecanismos que la regulan se desconocen.

Con respecto al estradiol, no hay estudios concluyentes sobre sus efectos en espermatozoides maduros. Algunos autores sugieren que su función es modular y/o inhibir los efectos de la progesterona sobre la capacitación, la hiperactivación (25) y la reacción acrosómica (26) ya que la exposición previa de espermatozoides humanos al estradiol inhibe la entrada de calcio inducida por progesterona. Otros autores proponen que el estradiol ejerce un efecto directo y estimulador sobre la capacitación, reacción acrosómica y capacidad fecundante porque estimula la salida de colesterol, lo que promueve un aumento del Ca^{2+} y la fosforilación de tirosinas (27). En cuanto a la quimiotaxis, los pocos estudios existentes no demuestran su papel como quimioatractivo, al menos en espermatozoides humano (28).

b. Melatonina

La melatonina es una hormona, que, además de muchas otras funciones, regula la reproducción en aquellas especies de mamíferos de reproducción estacional. Es secretada durante la noche por la glándula pineal y puede inhibir o estimular la reproducción en especies reproductoras de día largo o de día corto, respectivamente (29). La especie ovina es una especie de día corto, por lo que el aumento de la secreción de melatonina nocturna en otoño e invierno, cuando las noches son más largas, estimula su reproducción (30). Además, esta hormona también puede ser sintetizada por tejidos extrapineales (tracto gastrointestinal, piel, ojos...), incluyendo el tracto reproductor masculino,

especialmente en los testículos (31). También se ha detectado su presencia en el plasma seminal (32), así como en el tracto reproductor femenino. En concreto, ha sido identificada en el fluido folicular (33), el cual puede pasar al oviducto donde se produce la fecundación. Además, se ha demostrado su síntesis por parte de las células del cumulus en ovino (34). De esta forma, los espermatozoides estarían expuestos a diferentes concentraciones de melatonina tanto en el tracto reproductor masculino como femenino. Este hecho, junto con la presencia de receptores de esta hormona (MT1 y MT2) en la superficie de los espermatozoides (31, 35), permite atribuir, también, un posible papel a la melatonina como regulador de la funcionalidad espermática. Entre los efectos directos de la melatonina en los espermatozoides se encuentra la disminución del daño oxidativo y de marcadores apoptóticos (32), así como la modulación de la capacitación espermática. Nuestro grupo demostró que esta acción, en el morueco, es dosis-dependiente, favoreciendo dicha capacitación a concentraciones picomolares y disminuyéndola a concentraciones micromolares (32). Existen estudios que demuestran que la melatonina a concentración 1 μM reduce la fosforilación de tirosinas, y los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de AMPc (36).

El papel de la melatonina como sustancia quimiotáctica ha sido demostrado en estudios *in vitro* en diversas células somáticas y tumorales. Por ejemplo, en el caso de los neutrófilos, aumenta su índice quimiotáctico al exponerse a gradientes de concentraciones de melatonina entre 40 μM y 1,2 pM (37). Al inyectar intraperitonealmente en ratas una solución de melatonina a una concentración de 1 nM, se observó que dicha hormona ejercía efectos quimiotácticos sobre los leucocitos ya que se produjo un aumento del número de estas células en la cavidad peritoneal (37). Otro ejemplo son las células epiteliales de retina de pollo, sobre las que la melatonina ejerce su efecto quimiotáctico en un rango de entre 100 nM-100 μM (38). Sin embargo, hasta la fecha, no hay estudios que demuestren una acción quimiotáctica de la melatonina sobre espermatozoides.

En conclusión, tanto las hormonas esteroideas, progesterona y estradiol, como la melatonina están presentes formando un gradiente de concentración en el tracto reproductor femenino, todas ellas son capaces de unirse a los espermatozoides por medio de receptores específicos, y su unión activa una serie de rutas de transducción de señales que dan lugar a cambios implicados en procesos tan importantes como la capacitación. La capacitación, por su parte, se relaciona con un cambio en el patrón de movimiento o hiperactivación. Por ello, nos proponemos estudiar el papel de estas hormonas sobre el movimiento guiado de los espermatozoides hacia el ovocito.

2.5. Métodos de estudio de la quimiotaxis

A lo largo de los años se han ideado una variedad de métodos para el estudio de la migración celular espontánea y dirigida. Entre estos, el método de filtro de membrana introducido por Boyden en 1962, con sus modificaciones más recientes, se ha convertido en la técnica elegida para los estudios de quimiotaxis de leucocitos *in vitro* (39) y fibroblastos (40). Se basa en contar las células que han migrado a través de una membrana de filtro hacia una fuente de supuesto factor quimiotáctico. Un inconveniente es que el comportamiento celular resultante no se puede observar y solo puede deducirse de la distribución final de la población celular, lo que ha dado lugar a algunas afirmaciones falsas de quimiotaxis. Así, la confirmación inequívoca de la quimiotaxis requiere la observación directa de las células.

Hasta 1991, los métodos disponibles para estudiar y observar directamente la quimiotaxis se trataban de aplicar las células y la fuente del factor quimiotáctico a un portaobjetos y cubrirlas con un

ubreobjetos (41) o realizar el ensayo quimiotáctico en agarosa (42) o el uso de la cámara de Zigmond (43). De todos ellos, la cámara de Zigmond (figura 2.1.) tiene mejores propiedades ópticas y posee la ventaja de que el gradiente de concentración se aproxima a un estado estacionario lineal (44). Dicha cámara contiene dos pocillos conectados, uno de los cuales alberga los espermatozoides y el otro, la sustancia a testar. Los espermatozoides pueden nadar hacia la sustancia (quimioatrayente) o alejarse de ella (quimiorrepelente). Sin embargo, la capa de fluido sobre el puente generalmente era muy delgada y predecir la disminución del gradiente era muy difícil (44).

Para mejorar la cámara Zigmond se creó una nueva cámara, la cámara Dunn (Figura 2.2.), que permite la investigación de quimiotaxis en fibroblastos y consiste en un portaobjetos de cristal con dos pocillos concéntricos de 0,02 mm de profundidad y separados por un puente de 1 mm de ancho. El diseño de la cámara favorece la estabilidad a largo plazo del gradiente de quimioatrayente y una predicción confiable. Sin embargo, el análisis de datos es complicado por el diseño del puente anular que da como resultado una orientación variable del gradiente de quimioatrayente. La cámara Dunn ha sido usada para estudiar la quimiotaxis espermática en erizo de mar y en ratón (45) y en morueco (24) utilizando un análisis de datos distinto al empleado en el presente trabajo.

En 2005 se creó la cámara Ibidi (figura 2.3.), otra una herramienta utilizada para observar la respuesta quimiotáctica de células expuestas a gradientes químicos. Funciona para células adherentes en una superficie 2D, así como para células embebidas en una matriz de gel 3D. El uso de dicha cámara permite un análisis detallado y definido del comportamiento de migración de varios tipos de células, como las células endoteliales, fibroblastos, células cancerosas y células del sistema inmunitario. Además, con ella se han realizado ensayos quimiotácticos para espermatozoides humanos (46).



Figura 2.1. Cámara Zigmond

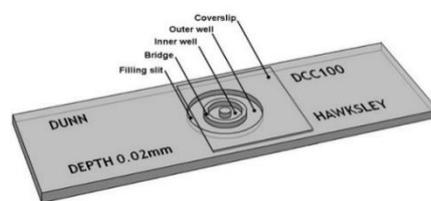


Figura 2.2. Cámara Dunn.



Figura 2.3. Cámara Ibidi.

A lo largo de los años se han desarrollado diversos métodos de análisis de la respuesta de los espermatozoides a una sustancia quimiotáctica.

Uno de ellos está basado simplemente en el seguimiento de la trayectoria del espermatozoide, atendiendo a la curvatura y la asimetría, y sus variaciones al someterlo a un gradiente de quimioatrayente. Dicho método se ha usado para realizar ensayos de quimiotaxis espermática en ascideas, sifonóforos y erizo de mar (47-49).

Existen también ensayos de acumulación espermática, en los que se necesitan dispositivos como por ejemplo la cámara Zigmond (50). Este tipo de métodos se han llevado a cabo en el estudio de la quimiotaxis espermática en humano, conejo y ratón (50, 51). Sin embargo, la mayoría de los ensayos de acumulación no pueden distinguir entre quimiotaxis espermática, acumulación, quimiokinesis, atrapamiento y/o muerte celular. No obstante, las cámaras de Zigmond también se han utilizado para el estudio de la orientación quimiotáctica en conejo (52) a través del ensayo de acumulación basado en la direccionalidad, que considera las trayectorias de cada espermatozoide conforme se dirige hacia el pocillo del quimioatrayente.

Otra forma de cuantificar la quimiotaxis en una población de espermatozoides es medir su dispersión o aglutinación, es decir, estudiando la cinética de la densidad celular en respuesta a la presencia o ausencia de un estímulo quimiotáctico (53).

Hoy en día, la tecnología permite analizar cada espermatozoide individualmente mediante algoritmos informáticos que segmentan las imágenes que componen un vídeo, caracterizan automáticamente la trayectoria de cada espermatozoide y calculan varios parámetros de movimiento. En 1993, Crenshaw desarrolló un método para analizar las respuestas quimiotácticas de trayectorias individuales en tres dimensiones (54).

Además de la curvatura y la asimetría de las trayectorias, existen otros parámetros de movimiento que reflejan con mayor precisión el comportamiento espermático, como los ángulos de direccionalidad relativos a la fuente del quimioatrayente, que miden la orientación de los espermatozoides. Riffell y sus compañeros (55), crearon el concepto de longitud media del vector lo cual consiste en incorporar información sobre los ángulos de orientación y calcular un vector unitario que refleja el comportamiento quimiotáctico, teniendo un valor de 1 cuando hay quimiotaxis, y un valor de 0 cuando no. Este método ha sido usado para el estudio de quimiotaxis en espermatozoides humanos (56).

Otro método para cuantificar la quimiotaxis espermática fue propuesto por Yoshida et al. (2002) (57). Este consiste en una ecuación lineal del índice quimiotáctico (LECI), que se calcula a partir de los cambios de la posición de la cabeza del espermatozoide en relación con la fuente del estímulo quimiotáctico.

Para evaluar de manera más precisa la quimiotaxis se propuso el uso de un determinado índice quimiotáctico (58) que considera la velocidad y la dirección del espermatozoide antes y después de un estímulo quimiotáctico. Este índice toma valores desde -1 (no existe quimiotaxis) hasta 1 (hay quimiotaxis). Para el análisis de este índice quimiotáctico se desarrollaron herramientas estadísticas que utilizan el lenguaje de programación R (59).

Antiguamente para realizar el análisis de la quimiotaxis espermática se realizaban grabaciones de las muestras y las trayectorias de todos los espermatozoides se trazaban a mano en una plantilla (60). A día de hoy, dicho análisis es mucho más fácil y avanzado ya que se han creado complejos softwares destinados a ello. Nuestro grupo desarrolló un software denominado OpenCASA (61), el cual permite estudiar tres parámetros clásicos de calidad del esperma: motilidad, morfometría e integridad (viabilidad) de la membrana y ofrece la posibilidad de analizar la respuesta quimiotáctica de espermatozoides a diferentes estímulos. Tras grabar un vídeo de una muestra espermática, el módulo de quimiotaxis proporciona información sobre el porcentaje de desplazamientos instantáneos que apuntan en la dirección del gradiente del quimioatrayente con respecto a los que no apuntan en la misma dirección, generando un índice quimiotáctico (*Ch index*).

Haciendo uso del software OpenCASA y dos cámaras de estudio de quimiotaxis (Dunn e Ibidi) se evaluó la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides ovinos frente a progesterona, estradiol y melatonina a diferentes concentraciones (100 pM y 1 μ M). Se realizó tanto en espermatozoides seleccionados por *swim up* (sin capacitar) como en espermatozoides capacitados *in vitro* (sin control) y con agentes elevadores del AMPc (*cocktail*) para comparar el efecto quimiotáctico de las hormonas dependiendo del estado de capacitación.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La progesterona y el estradiol, así como la melatonina, son secretadas por las células del cúmulus que rodean al ovocito y además se pueden encontrar en el fluido folicular y en las cercanías del ovocito (20, 34). Por ello, se encontrarían formando un gradiente de concentración desde las proximidades del ovocito hasta regiones más distales del tracto reproductor femenino. Esto podría dar lugar a una respuesta quimiotáctica, permitiendo que el espermatozoide sea guiado hasta el ovocito y se dé una correcta fecundación. Además, los espermatozoides ovinos poseen receptores de membrana tanto para estradiol y progesterona (24), como para melatonina (35). Por ello, podrían estar involucradas en el proceso de capacitación del espermatozoide ovino durante la fecundación.

En el caso de la progesterona se ha demostrado que existe acción quimiotáctica en espermatozoides humanos y de conejo (17) y con respecto a la melatonina se ha visto que es una sustancia quimioatrayente en diversas células tumorales y somáticas, como los leucocitos (37). Hasta la fecha no existen resultados concluyentes acerca del papel quimiotáctico de estas tres hormonas en espermatozoides ovinos.

En vista a los antecedentes expuestos, la **hipótesis** que se plantea en este trabajo es que la progesterona, el estradiol y la melatonina son hormonas que pueden influir en la funcionalidad espermática y ejercer un efecto quimiotáctico sobre los espermatozoides ovinos, guiándolos hacia el ovocito para una exitosa fecundación.

Por lo tanto, los objetivos de este trabajo son:

1. Estudiar el posible efecto quimioatrayente de la progesterona, el estradiol y la melatonina, a diferentes concentraciones, sobre espermatozoides ovinos seleccionados por *swim up* y capacitados *in vitro*.
2. Comparar y determinar la influencia del estado de capacitación espermática en la respuesta quimiotáctica.
3. Comparar el uso de dos dispositivos diferentes para estudiar la quimiotaxis en espermatozoides ovinos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Obtención de las muestras seminales

El semen empleado para los experimentos se obtuvo a partir de moruecos adultos de la Asociación Nacional de Ganaderos de *Rasa Aragonesa* (ANGRA) y estabulados en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Zaragoza. Las extracciones se realizaron en días alternos, mediante vagina artificial, y se obtuvieron dos eyaculados consecutivos de cada morueco. Sólo los segundos eyaculados fueron usados en los experimentos debido a que está demostrado que éstos tienen mejores parámetros de calidad (62). Tras la recogida de las muestras se mezclaron entre sí para evitar diferencias individuales y se mantuvieron a 37 °C hasta su uso en el laboratorio.

4.2. Selección espermática por el método *swim-up*/dextrano

El semen está constituido por los espermatozoides y el plasma seminal, conjunto de secreciones procedentes mayoritariamente de las glándulas sexuales accesorias. El plasma seminal, a largo plazo, ejerce efectos perjudiciales sobre la motilidad y la viabilidad espermática. Por ello, y para evitar interferencias de sus componentes en los resultados, es conveniente separar los espermatozoides de este plasma seminal. El método de *swim-up*/dextrano es un método de lavado y selección espermática que permite obtener muestras de alta motilidad y viabilidad, sin la presencia del plasma seminal. El fundamento consiste en aprovechar la capacidad de los espermatozoides de “nadar” hacia la superficie de un tubo, atravesando una capa intermedia rica en dextrano que dificulta su movimiento. El procedimiento estándar para esta técnica requiere de centrifugación, pero ejerce un efecto nocivo sobre las células espermáticas ovinas. Por ello, se han desarrollado variantes de *swim-up* que no llevan a cabo dicho proceso, evitando así el daño mecánico. En este trabajo se ha usado una de estas variantes, la cual fue desarrollada para espermatozoides humanos (63) y ha sido adaptada a los espermatozoides ovinos por nuestro grupo de investigación (64).

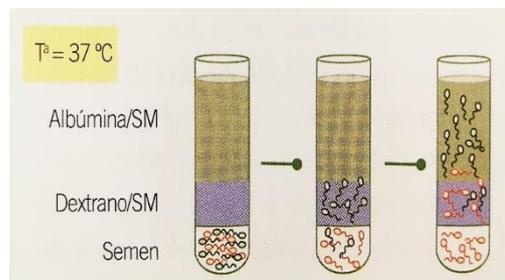


Figura 4.1. Representación esquemática del método de selección espermática *swim-up*/dextrano.

El medio usado para el *swim-up* fue el mHTF (*modified Human Tubular Fluid Medium*) cuya composición es: NaCl 50 mM, KCl 10 mM, MgSO_4 0,4 mM, K_2HPO_4 0,3 mM, HEPES 21 mM, glucosa 2,8 mM, piruvato sódico 0,3 mM, lactato sódico 18,6 mM y sacarosa 200 mM (pH 6,5). Para llevar a cabo el *swim-up* se colocó una alícuota de 0,5 ml de semen fresco en el fondo de un tubo redondeado de 15 mm de diámetro. Sobre él se deposita 0,5 ml de medio mHTF-dextrano (30 mg dextrano/ml mHTF) y encima de éste 1,5 ml de medio de recogida o mHTF-A (5 mg albúmina sérica bovina (BSA)/ml mHTF). La BSA impide la aglutinación de los espermatozoides. Se incubaron los tubos a 37 °C durante 15 minutos y se retiraron 0,75 ml de la parte superior del tubo, descartándose por contener restos de plasma seminal. Después, se añadió el mismo volumen (0,75 ml) de mHTF-A y se incubó de nuevo 15 minutos. Esta secuencia de incubación se repitió tres veces más, recogiendo los tres sobrenadantes posteriores y mezclándolos para dar lugar a la muestra *swim-up* de espermatozoides seleccionados.

4.3. Cálculo de la concentración espermática

La concentración espermática ha sido determinada mediante una cámara de Neubauer.

Para ello, la muestra swim-up se diluyó 1/100 (v/v) con agua para su inmovilización. Se colocó una gota de 6 µl de dicha dilución en la cámara de Neubauer y se contó el número de espermatozoides en 16 cuadrículas de la cámara utilizando el objetivo 10X de un microscopio de contraste de fases. Para calcular la concentración se utilizó la siguiente fórmula:

$$C = n^{\circ} \text{ espermatozoides contados} \times 10^4 \text{ ml} \times \frac{1}{\text{dilución}} = \frac{\text{espermatozoides}}{\text{ml}}$$

4.4. Inducción de la capacitación *in vitro*

Como algunos autores han descrito que sólo los espermatozoides capacitados son capaces de mostrar una respuesta quimiotáctica (14), en el presente trabajo se hizo necesario llevar a cabo el proceso de capacitación *in vitro* de los espermatozoides ovinos para estudiar y comparar el efecto quimiotáctico de las hormonas tanto en espermatozoides capacitados como en no capacitados (muestra *swim-up*).

El medio usado para inducir este proceso es un medio definido que imita la composición del fluido oviductal, denominado medio TALP (NaCl 100 mM, KCl 3,1 mM, NaH₂PO₄ · 2H₂O 25 mM, ácido láctico 0,3 mM, MgCl₂ · 6H₂O 21,6 mM, HEPES 3 mM, ácido pirúvico 0,4 mM, NaHCO₃ 25 mM, CaCl₂ 3 mM, BSA 5mg/ml, pH 7,2). Para capacitar espermatozoides ovinos *in vitro* es necesario añadir además una serie de sustancias (db-cAMPc 1mM, cafeína 1 mM, teofilina 1mM, ácido okadaico 0,2 µM, metil-β-ciclodextrinas 2,5mM), que denominamos *cocktail*, y que incrementan el AMPc, asegurando la capacitación *in vitro* de los espermatozoides ovinos (65). Para una correcta capacitación *in vitro* se necesitan estufas especiales que simulan las condiciones del interior del tracto reproductor femenino. En este caso, se incubaron alícuotas de 1,6 x 10⁸ espermatozoides/ml durante 3 horas a 39 °C, con un 5 % de CO₂ y una humedad del 100 %. A las muestras incubadas en medio TALP se les denominó muestras capacitadas control (C) y a las incubadas en TALP + *cocktail*, muestras *cocktail* (K).

4.5. Evaluación de las muestras espermáticas

4.5.1. Análisis de la motilidad espermática

La determinación de la motilidad espermática se realizó utilizando un sistema automatizado y computerizado de análisis llamado genéricamente CASA (*Computer Assisted Semen Analysis*). En concreto se utilizó el ISAS1.0.4 (Proiser SL, Valencia, España), que emplea una cámara de vídeo (Basler A312f; Basler Vision, Exton, PA) montada en un microscopio de contraste de fases (Nikon eclipse 50i, Nikon, Tokyo, Japan). Las muestras *swim-up* se diluyeron 1/5 en medio bifase (sacarosa 0,25 M, EGTA 0,1 mM, fosfato sódico 4 mM y tampón HEPES 10x 10% (v/v), pH 7,5), mientras que las capacitadas (control y *cocktail*), se diluyeron 1/2 en el mismo medio. Se colocaron 7 µL de la muestra a analizar entre un portaobjetos y un cubreobjetos, previamente atemperados a 37 °C. Con el microscopio de contraste de fases (10X), un ordenador y el programa ISAS, se evaluaron 5 campos. El programa analiza la trayectoria de los espermatozoides y clasificarlos atendiendo a su motilidad. De esta manera, se obtienen valores de motilidad total (porcentaje de espermatozoides móviles) y motilidad progresiva (porcentaje de espermatozoides que se desplazan mediante una trayectoria rectilínea).

4.5.2. Evaluación de la integridad de la membrana plasmática: viabilidad

La integridad de la membrana plasmática o viabilidad se evaluó mediante el método de doble tinción con yoduro de propidio y diacetato de carboxifluoresceína (IP/CFDA) (66). Mediante esta técnica se

pueden diferenciar los espermatozoides viables (con membrana plasmática intacta) de los no viables, gracias a la diferente fluorescencia que adquieren tras su incubación con estos dos colorantes. El diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) es un compuesto incoloro, poco ionizado, que penetra en todas las células por difusión a través de la membrana. Las esterasas intracelulares lo hidrolizan dando lugar a acetato de fluoresceína que emite fluorescencia verde. Este compuesto, al poseer carga eléctrica, no puede atravesar la membrana intacta y queda retenido dentro de la célula, salvo si la membrana está dañada. Por ello, los espermatozoides viables con la membrana íntegra se ven verdes bajo una iluminación fluorescente. Sin embargo, los espermatozoides con la membrana dañada (no viables), dejan escapar la fluoresceína. Para poder visualizar los espermatozoides no viables se usa el yoduro de propidio (IP), que se une al DNA y que emite fluorescencia roja, permitiendo su visualización.

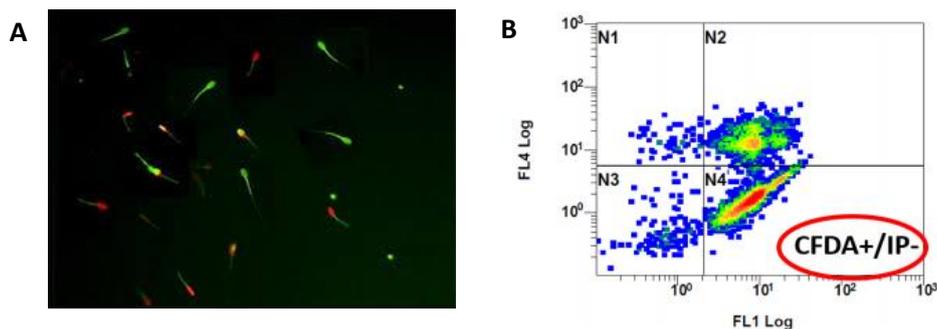


Figura 4.2. A) Doble tinción de espermatozoides ovinos con diacetato de carboxifluoresceína y yoduro de propidio (CFDA/IP). La imagen ha sido tomada a partir de un microscopio de fluorescencia en filtro B-2A (filtro de excitación 450-490 nm) y G-2A (filtro de excitación 510-560 nm), a un aumento de 400X. **B)** Imagen representativa de las distintas poblaciones espermáticas obtenidas por citometría de flujo con la doble tinción de viabilidad CFDA/IP, utilizando los fotodetectores FL1 y FL4.

La muestra *swim-up* se diluyó 1/60 en medio bifase alcanzando una concentración de 6×10^6 células/ml. Se añadió 3 μ l de diacetato de carboxifluoresceína (concentración final de 1 mM), 3 μ l de yoduro de propidio (concentración final de 1,5 mM) y 3 μ l de formaldehído (0,5 % v/v) para fijar las células y lograr una mejor visualización. En el caso de las muestras capacitadas se realizó una dilución 1/2 y se añadieron los mismos reactivos. Las muestras teñidas se incubaron a 37 °C durante 10 minutos en oscuridad. Se evaluaron mediante un citómetro de flujo (FC 500, Beckman Coulter INC., Pasadena, CA, EEUU), que usa láser de argón a 488 nm. Para determinar la viabilidad de los espermatozoides, se utilizaron los filtros FL1-525 \pm 5 nm (para CFDA) y FL4-675 \pm 5 nm (para IP). Se contaron 20.000 eventos (500-1.000 eventos/segundo) y se diferenciaron espermatozoides IP-/CFDA+ (viables, con membrana intacta) y espermatozoides IP+/CFDA- (no viables, con membrana dañada) (Figura 4.2.B).

4.6. Determinación del estado de capacitación: tinción con clorotetraciclina

La clorotetraciclina o CTC es un antibiótico que emite fluorescencia amarilla y puede penetrar en la célula espermática y unirse al calcio intracelular proporcionando patrones característicos de fluorescencia según la distribución de este catión dentro de la célula. Según el estado de capacitación, aparecen diferentes patrones de fluorescencia que permiten diferenciar los espermatozoides no capacitados, capacitados y aquellos que han sufrido la reacción acrosómica (67). Esta técnica fue validada posteriormente para semen ovino por nuestro grupo de investigación (3).

Para preparar la solución de clorotetraciclina, se mezclaron 2 mg de CTC con 5 ml de un tampón compuesto por TRIS 20 mM, NaCl 130 mM y DL-Cisteína 5 μ M, pH 7,8. La solución de CTC se agitó en balancín para su correcta disolución y se conservó en refrigeración y oscuridad hasta su uso. Para llevar a cabo la tinción se mezclaron 18 μ l de muestra (*swim-up* o capacitada), 20 μ l de la solución de CTC y 5 μ l de solución de fijación (paraformaldehído al 1,25% (p/v) en tampón TRIS-HCl 0,5 M, pH 7,4) y se incubó a 4 °C durante al menos 30 minutos. Posteriormente, en un portaobjetos se depositó una gota de 3 μ l de DABCO (trietilnediamino 0,22M (DABCO), Sigma Chemical Co., Madrid, Spain) diluido en glicerol:PBS (9:1 v/v) para conservar la fluorescencia, y sobre éste, se añadieron 5 μ l de la muestra espermática. Se colocó el cubreobjetos, se selló dicha preparación con esmalte y finalmente se conservó en el congelador hasta su visualización. Todo el proceso se realizó en oscuridad.

Las muestras se visualizaron mediante un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E-400) con un filtro V-2A (filtro de 420-490 nm de excitación y 510 nm de emisión). Se usó el objetivo de inmersión con aumento 100X y se contaron 100 espermatozoides por cada preparación. Se pudieron distinguir tres poblaciones espermáticas según el patrón de tinción: no capacitados o NC (distribución homogénea de la fluorescencia en la cabeza del espermatozoide, con o sin banda ecuatorial brillante), capacitados o C (fluorescencia en la región anterior de la cabeza) y espermatozoides con el acrosoma reaccionado o R (sin fluorescencia en la cabeza o sólo una banda a nivel ecuatorial).

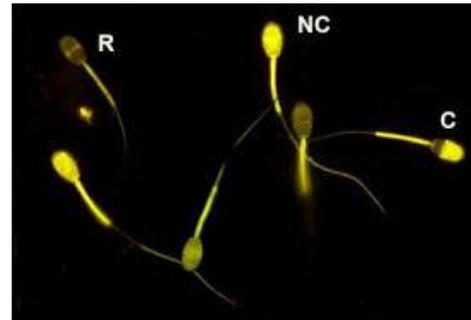


Figura 4.3. Imagen de las poblaciones espermáticas obtenidas tras la tinción con clorotetraciclina y visualizadas con microscopía de fluorescencia bajo filtro V-2A y aumento 100X. Se distinguen espermatozoides no capacitados o NC, espermatozoides capacitados o C y espermatozoides reaccionados o R.

4.7. Estudio de la posible quimiotaxis espermática producida por progesterona, estradiol y melatonina

Los espermatozoides, sometidos a un gradiente de concentración de las mencionadas hormonas, se grabaron con una cámara de vídeo (acA1920-155uc, Basler, Exton, PA) conectada a un microscopio de contraste de fases (Nikon eclipse 50i, Nikon, Tokyo, Japan), y se analizaron los cambios en su trayectoria mediante el módulo de quimiotaxis disponible en el software libre desarrollado por nuestro grupo de investigación, llamado OpenCASA (61). El estudio se realizó con dos dispositivos o cámaras comerciales para el estudio de la quimiotaxis: la cámara Dunn y la cámara Ibidi. Cada hormona fue ensayada a dos concentraciones distintas (100 pM y 1 μ M), en cada una de las cámaras, repitiéndose 4 veces cada experimento. Se realizaron otros tantos experimentos en ausencia de hormonas, poniendo en el medio circundante 1/10000 (v/v) de DMSO (dimetilsulfóxido), que es el diluyente en el que se preparan las hormonas (muestras control). Además, como la quimiotaxis se ha descrito en otras especies únicamente en espermatozoides capacitados (14), se incluyeron en el estudio de la quimiotaxis dos grupos experimentales: espermatozoides sin capacitar (muestra *swim up*) y espermatozoides capacitados *in vitro* (capcitados control y *cocktail*).

La cámara Dunn (Hawksley, UK) (figura 2.2.) consiste en un portaobjetos de cristal con dos pocillos concéntricos de 0,02 mm de profundidad y separados por un puente de 1 mm de ancho. En el pocillo interior se colocaron 30 μ l de la muestra de espermatozoides a una concentración de $1,6 \times 10^7$

células/ml y en el exterior 90 μ l de medio mHTF sin o con hormona. En este último caso se crea un gradiente de concentración radial. Se evaluaron las trayectorias de los espermatozoides que son capaces de llegar al puente al ser atraídos por la hormona y que se encuentran dentro del cono quimiotáctico. Se grabaron 4 vídeos de 3 segundos en la región izquierda del puente para cada muestra espermática y para cada hormona.

La cámara Ibidi (Ibidi GmbH) (figura 2.3.) sirve para estudiar la quimiotaxis de células de migración lenta (68), aunque existen algunos estudios llevados a cabo con espermatozoides (69). Un solo dispositivo posee tres cámaras, cada una con dos reservorios laterales conectados por un puente. En el puente central y en los laterales de cada cámara, se colocaron 6 μ l y 65 μ l de la muestra de espermatozoides (*swim up* o capacitados), respectivamente. Tras esto, se añadió en uno de los reservorios laterales de la cámara 30 μ l de medio mHTF sin o con hormonas, aspirando y eliminando la misma cantidad de líquido para que quedase espacio y se estableciese un gradiente. En este caso la hormona se diluyó con muestra espermática, para que la concentración de espermatozoides fuese homogénea en toda la cámara. Así, tanto la muestra de espermatozoides como la dilución con la hormona contenían 5×10^6 células/ml. Se analizaron los ángulos de las trayectorias de cada espermatozoide dirigido hacia la hormona, grabando 4 vídeos de 3 segundos en el puente central para cada muestra espermática y para cada hormona.

Todos los vídeos se analizaron con el módulo de quimiotaxis del software OpenCASA, el cual detecta las coordenadas de las trayectorias de los espermatozoides y las representa normalizándolas a un mismo punto de referencia. Se selecciona una región cónica del plano para delimitar el área donde consideramos que existe gradiente de hormona (cono quimiotáctico). El software analiza automáticamente los vídeos mediante el análisis del índice quimiotáctico (*Ch index*), el cual permite evaluar la existencia de quimiotaxis. El *Ch index* representa el porcentaje de desplazamientos (ángulos) instantáneos que apuntan en la dirección del gradiente quimioatractivo con respecto al número total de ángulos tenidos en cuenta. Por ello, cuanto mayor es el índice, habrá mayor cantidad de ángulos en dirección al gradiente y por ello mayor quimioatracción.

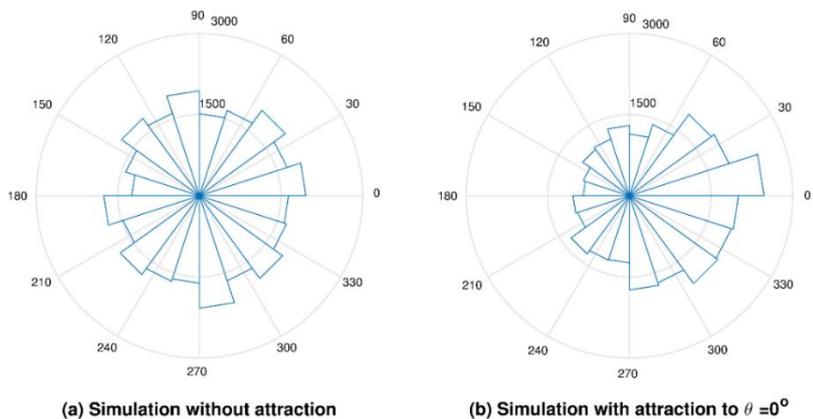


Figura 4.4. Dos ejemplos de la distribución de ángulos instantáneos. (a) Población de espermatozoides sin quimiotaxis. (b) Población de espermatozoides quimioatraída, con un ángulo de llegada de la sustancia quimiotáctica de 0° (derecha) (61).

4.8. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software *GraphPad InStat* (5.01; San Diego, CA, USA). En concreto, el análisis estadístico se realizó por χ^2 para examinar las diferencias significativas en la motilidad, en la viabilidad, en el estado de capacitación y en el análisis de la quimiotaxis. Los resultados se muestran como la media \pm error estándar de la media.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para llevar a cabo el análisis de la respuesta quimiotáctica a la melatonina, antes de cargar las muestras espermáticas en las diferentes cámaras, fue necesario valorar previamente el estado fisiológico en el que se encontraban los espermatozoides. Para ello, se evaluó su motilidad, viabilidad (integridad de membrana plasmática), y estado de capacitación. Posteriormente, una vez comprobado que los espermatozoides tenían buena motilidad y viabilidad, y que existían las diferencias esperables entre muestras frescas y capacitadas en cuanto a estado de capacitación, se analizó su respuesta quimiotáctica frente a las 3 hormonas en estudio (progesterona, estradiol y melatonina). Se llevaron a cabo 4 experimentos con cada tipo de muestra (sin capacitar, capacitadas control y *cocktail*), con cada concentración de hormona o en ausencia de ellas, y en cada una de las cámaras (Dunn e Ibidi). Todos los experimentos se llevaron a cabo en época reproductiva del morueco (de octubre hasta marzo). Finalmente se realizó el análisis de los vídeos mediante el programa Open-CASA, obteniéndose los índices de quimiotaxis (Ch index).

5.1. Ensayos de quimiotaxis utilizando la cámara Dunn

5.1.1. Análisis del estado de las muestras espermáticas

Las muestras espermáticas utilizadas para los experimentos de quimiotaxis utilizando la cámara Dunn mostraron valores de motilidad y viabilidad adecuados para llevar a cabo los ensayos.

Las muestras obtenidas tras el *swim-up* mostraron un valor medio de $91 \pm 0,75$ % de motilidad total y un $35 \pm 2,38$ % de motilidad progresiva. Estos valores disminuyeron significativamente tras el proceso de capacitación *in vitro* (Fig. 5.1)

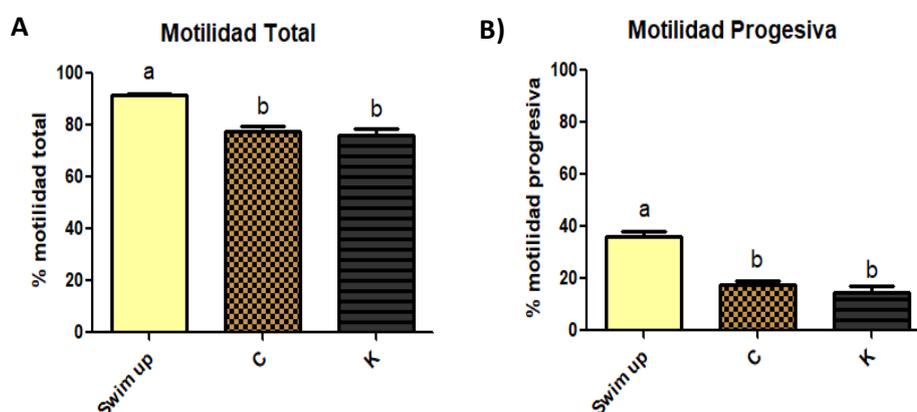


Figura 5.1. Porcentaje de espermatozoides móviles totales (A) o con motilidad progresiva (B) en las muestras *swim-up* y las capacitadas control (C) y *cocktail* (K) que se cargaron en la cámara Dunn. Los resultados se muestran como media \pm SEM de 9 experimentos. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,0001$).

Como ya se ha comentado previamente, la capacitación es un proceso que está relacionado con la hiperactivación espermática (5). La hiperactivación es un cambio en el patrón de movimiento de los espermatozoides de mamíferos en el oviducto, el cual es esencial para la fecundación. Dicha hiperactivación se caracteriza por una alta y asimétrica amplitud y una baja frecuencia del movimiento oscilatorio del flagelo. De esta manera, conforme los espermatozoides se capacitan, adquieren este movimiento, disminuyendo sus trayectorias rectilíneas. Por ello, en el caso de las muestras

capacitadas, se ve disminuida la motilidad progresiva, además de la total. Además, también disminuyó el porcentaje de espermatozoides viables (con membrana íntegra) (Fig. 5.2), debido al paso del tiempo (la capacitación dura 3 horas) y al efecto de los agentes capacitantes sobre la membrana acrosomal (el paso siguiente a la capacitación es la reacción acrosómica que implica la rotura de la membrana acrosomal externa).

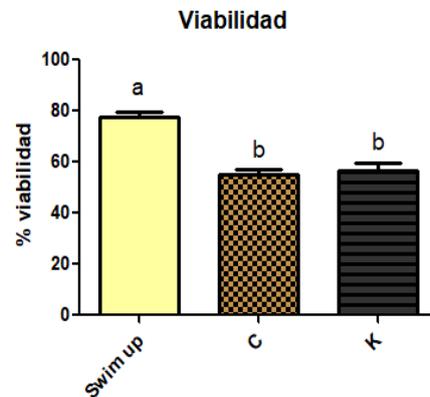


Figura 5.2. Porcentaje de espermatozoides viables (con la membrana plasmática íntegra) en las muestras *swim-up* y las capacitadas control (C) y *cocktail* (K) que se cargaron en la cámara Dunn. Los resultados se muestran como media \pm SEM de 9 experimentos. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,0001$).

Para comprobar que realmente esta capacitación *in vitro* se estaba produciendo correctamente, y poder relacionar posibles cambios en el comportamiento quimiotáctico con el estado de capacitación, se valoró el porcentaje de espermatozoides capacitados en las distintas muestras mediante la tinción con clorotetraciclina (CTC). Como se puede observar en la figura 5.3., la capacitación se llevó a cabo de forma exitosa, ya que el porcentaje de espermatozoides capacitados aumentó significativamente en las muestras capacitadas control y, especialmente en las muestras *cocktail*, que son las que contienen la mezcla de sustancias elevadoras del AMPc, y por tanto, estimulantes de la capacitación. Obviamente, este aumento de los espermatozoides capacitados es concomitante con una disminución de los no capacitados. Además, como los espermatozoides capacitados son los que pueden llegar a experimentar la reacción acrosómica (4), es lógico que el porcentaje de espermatozoides reaccionados sea mayor en las muestras capacitadas.

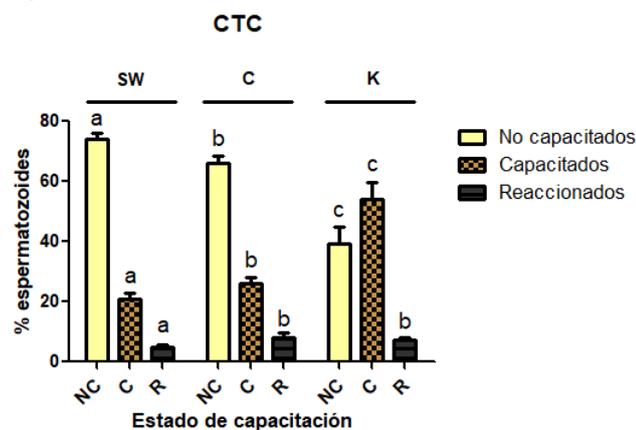


Figura 5.3. Porcentaje de espermatozoides capacitados, no capacitados y reaccionados en las muestras *swim-up* y las muestras capacitadas (C y K) durante los experimentos con la cámara Dunn. Los resultados se muestran como media \pm SEM de 9 experimentos. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,0001$) entre las distintas condiciones.

5.1.2. Estudio del posible efecto quimiotáctico de la progesterona, el estradiol y la melatonina sobre los espermatozoides ovinos utilizando la cámara Dunn

En vista de los antecedentes previamente expuestos sobre la progesterona, el estradiol y la melatonina, cabría la posibilidad de que estas hormonas influyeran en la orientación espermática en moruecos, comportándose como quimioatrayentes. Se evaluó la quimiotaxis en espermatozoides seleccionados por *swim up*, sometidos o no a capacitación *in vitro* para comprobar si el estado de capacitación influye en la respuesta quimiotáctica. En primer lugar, se utilizó la cámara Dunn, y se efectuó un análisis del índice quimiotáctico (*Ch index*) utilizando el programa Open-CASA.

5.1.2.1. Análisis del índice quimiotáctico (*Ch index*) utilizando la cámara Dunn

Como se puede observar en la figura 5.4., la presencia de progesterona, tanto a concentración 100 pM como a 1 µM, dio lugar a un aumento significativo del índice quimiotáctico en comparación con la muestra sin hormona, solamente en el caso de los espermatozoides que no fueron sometidos a capacitación *in vitro* (*swim-up*). Para las otras dos hormonas, estradiol y melatonina, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el índice quimiotáctico entre las muestras sin hormona y con hormona (a ninguna de las dos concentraciones), ni para espermatozoides sometidos a capacitación *in vitro* (control o *cocktail*) ni sin capacitar (*swim-up*).

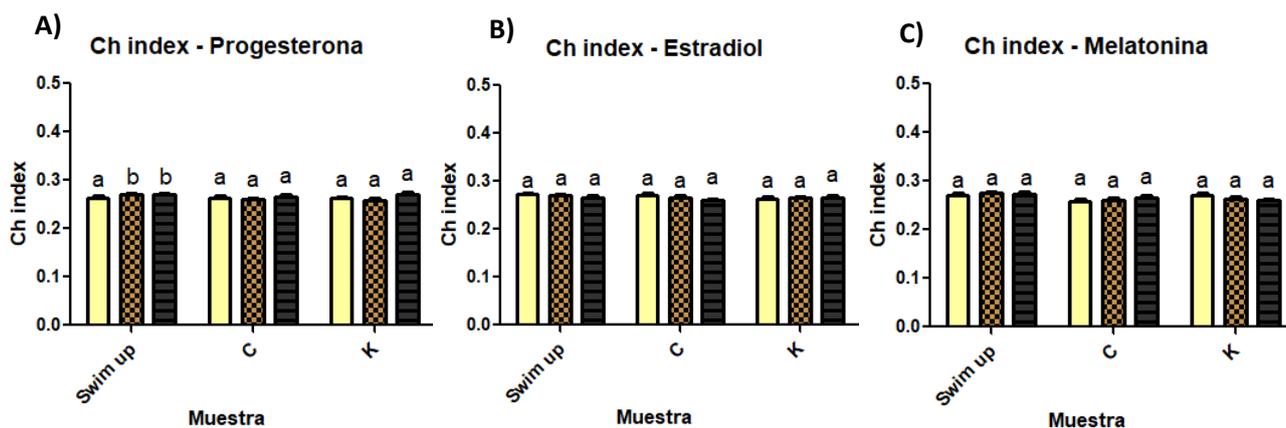


Figura 5.4. Representación gráfica del índice quimiotáctico (*Ch index*) obtenido para muestras sin capacitar (*swim up*) o capacitadas control (C) y *cocktail* (K) utilizando la cámara Dunn con progesterona (A), con estradiol (B) o con melatonina (C) a concentraciones 100 pM y 1 µM en el pocillo exterior. Los resultados se muestran como media ± SEM de 9 experimentos. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,0001$) entre las diferentes concentraciones de hormona dentro de la misma muestra (*swim up*, C o K).

5.2. Ensayos de quimiotaxis utilizando la cámara Ibidi

5.2.1. Análisis del estado de las muestras espermáticas

Las muestras espermáticas utilizadas para los experimentos de quimiotaxis utilizando la cámara Ibidi también mostraron valores de motilidad y viabilidad adecuados para llevar a cabo los ensayos.

Al igual que ocurría con las muestras analizadas en los ensayos anteriores (apartado 5.1.1.), los espermatozoides sometidos a capacitación *in vitro* mostraron una motilidad total y progresiva menor que la muestra *swim up* debido a que sufren hiperactivación espermática y disminuyen las trayectorias rectilíneas (Fig. 5.5).

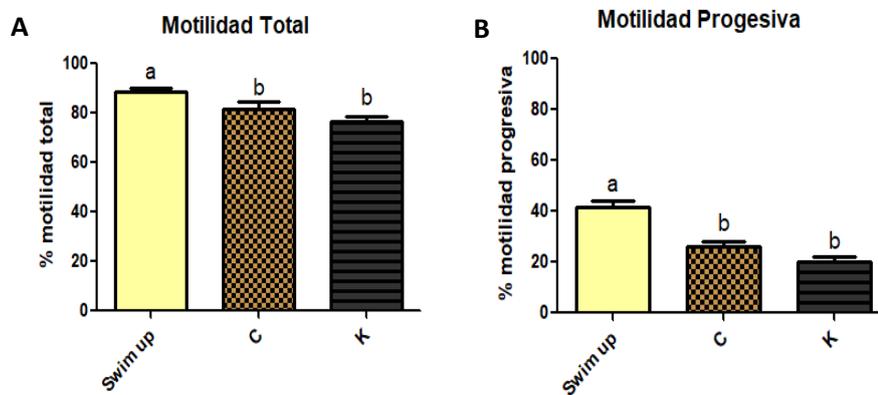


Figura 5.5. Porcentaje de espermatozoides mótils totales (A) o con motilidad progresiva (B) en las muestras *swim-up* y las capacitadas control (C) y cocktail (K) que se cargaron en la cámara Ibidi. Los resultados se muestran como media \pm SEM de 12 experimentos. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,0001$).

Del mismo modo, al igual que ocurría en los ensayos anteriores (apartado 5.1.1.), también disminuyó el porcentaje de espermatozoides viables (con membrana íntegra) en las muestras sometidas a capacitación en comparación con las muestras sin capacitar (*swim-up*) (Fig. 5.6), debido al paso del tiempo y el efecto de los agentes capacitantes sobre la membrana acrosomal.

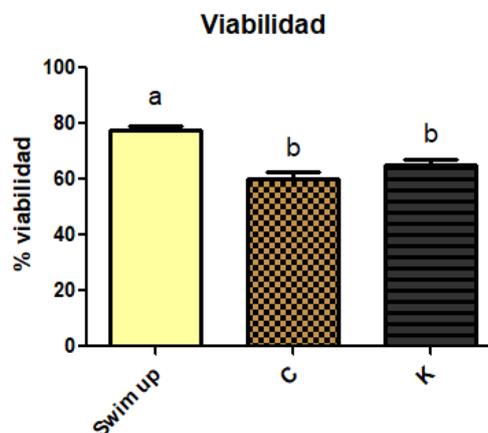


Figura 5.6. Porcentaje de espermatozoides viables (con la membrana plasmática íntegra) en las muestras *swim-up* y las capacitadas control (C) y cocktail (K) que se cargaron en la cámara Ibidi. Los resultados se muestran como media \pm SEM de 12 experimentos. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,0001$).

Con respecto al análisis del estado de capacitación de los espermatozoides (Fig. 5.7), la capacitación *in vitro* en presencia de agentes elevadores del AMPc (*cocktail*) dio lugar a un aumento significativo de espermatozoides capacitados ($P < 0,0001$) y, en menor medida de aquellos que sufrieron la reacción acrosómica (reaccionados) con respecto a la muestra *swim up*. En el caso de las muestras capacitadas control (sin agentes elevadores del AMPc), sólo se observaron diferencias en el porcentaje de espermatozoides reaccionados.

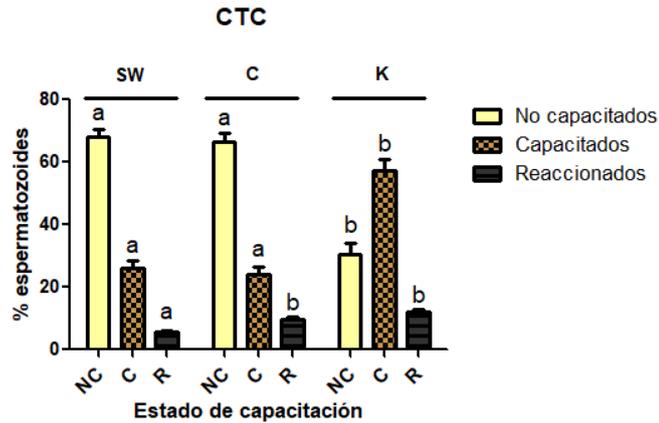


Figura 5.7. Porcentaje de espermatozoides capacitados, no capacitados y reaccionados en las muestras *swim-up* y las capacitadas (C y K) durante los experimentos con la cámara Ibidi. Los resultados se muestran como media \pm SEM de 12 experimentos. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,0001$) en cada estado de capacitación entre las distintas muestras.

5.2.2. Estudio del posible efecto quimiotáctico de la progesterona, el estradiol y la melatonina sobre los espermatozoides ovinos utilizando la cámara Ibidi

5.2.2.1. Análisis del índice quimiotáctico (*Ch index*) utilizando la cámara Ibidi

Cuando se estudió el índice quimiotáctico utilizando la cámara Ibidi, se observaron diferencias significativas en el caso de las 3 hormonas ensayadas.

En cuanto a los ensayos con progesterona (Fig. 5.8.A), el índice quimiotáctico aumentó significativamente ($P < 0,0001$) en presencia de ambas concentraciones de hormona, en comparación con la muestra sin hormona, en el caso de espermatozoides sometidos a capacitación *in vitro* con agentes elevadores del AMPc (*cocktail*). En el caso de la muestra control, sólo se observó el aumento para la concentración de 100 pM, mientras que cuando se cargaron en la cámara espermatozoides sin capacitar (*swim up*), no se evidenció ninguna diferencia debida al gradiente hormonal.

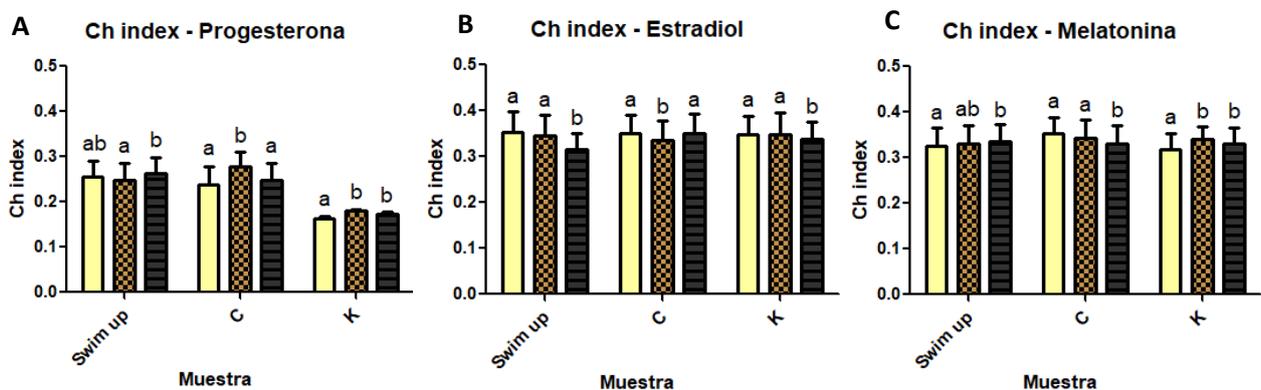


Figura 5.8. Representación gráfica del índice quimiotáctico (*Ch index*) obtenido para muestras sin capacitar (*swim up*) o capacitadas control (C) y *cocktail* (K) utilizando la cámara Ibidi con progesterona (A), con melatonina (B) o con estradiol (C) a concentraciones 100 pM y 1 μ M. Los resultados se muestran como media \pm SEM de 12 experimentos. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,0001$) entre las diferentes concentraciones de hormona dentro de la misma muestra (*swim up*, C o K).

La capacidad quimioatrayente de la progesterona ha sido descrita por varios grupos (13) en espermatozoides de otras especies, como humanos o de conejo, pero, hasta la fecha, no en la especie ovina. Algunos grupos confirman este efecto sólo en respuesta a un gradiente de progesterona 100 pM (17), lo que respaldarían los resultados obtenidos con espermatozoides capacitados control. Esto podría deberse a que una concentración alta de progesterona produciría una saturación de los receptores para esta hormona en la membrana del espermatozoide y, por tanto, una disminución de la capacidad de respuesta. En el caso de los capacitados *cocktail*, puede que debido a los cambios más pronunciados en la membrana espermática producidos por la mezcla de los agentes capacitantes, el efecto de la progesterona sea evidente a las dos concentraciones.

Con respecto a los ensayos de quimiotaxis con melatonina (Fig. 5.8.B), se observa una disminución significativa del índice quimiotáctico en la muestra capacitada control (C) sometida a concentraciones de 1 μ M de melatonina. Sin embargo, en la muestra capacitada *cocktail* (K) aumenta el índice quimiotáctico tanto para concentraciones de 100 pM como para concentraciones de 1 μ M. Esto podría deberse a que la melatonina a concentración 1 μ M ejerce una acción descapacitante (32) y por ello puede provocar que los espermatozoides respondan menos que la muestra sin hormona al no estar capacitados. Sin embargo, en las muestras *cocktail* la capacitación es tan alta que la melatonina no puede ejercer este efecto y, por lo tanto, no se aprecian diferencias. Estos resultados sugieren una acción quimiotáctica de la melatonina para espermatozoides ovinos capacitados en presencia de agentes elevadores del AMPc.

Al igual que ocurría con la progesterona, cuando se cargó en la cámara Ibidi la muestra *swim up* (sin capacitar), no se observaron diferencias significativas debido a la presencia de la melatonina a ninguna de las dos concentraciones ensayadas. Esto confirmaría el hecho de que sólo los espermatozoides capacitados muestran respuesta quimiotáctica (50).

Finalmente, en los experimentos realizados con estradiol, la presencia de esta hormona no aumenta el índice quimiotáctico a ninguna concentración ni en ningún tipo de muestra. Es más, en algunos casos, la exposición a un gradiente de esta hormona, disminuye significativamente este índice, por lo que se podría pensar que esta hormona podría tener un efecto quimiorrepelente para los espermatozoides ovinos.

Las diferencias con respecto a los resultados obtenidos con la cámara Dunn, podrían ser debidos al propio diseño de las cámaras. En la cámara Dunn, los espermatozoides reciben la influencia de las hormonas en todas las direcciones, ya que el pocillo donde están las células y el que es llenado con el medio con hormona, son concéntricos. Esto puede hacer más complicado discernir el área de influencia de las hormonas, y por tanto la respuesta ante el gradiente de las mismas. Sin embargo, en la cámara Ibidi, los espermatozoides reciben el gradiente de hormona de manera lineal (solo desde un lateral), y esto permite evidenciar mejor los efectos de dichas hormonas sobre la direccionalidad espermática.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se extraen de este trabajo, en base a los resultados obtenidos, son las siguientes:

1. Sólo se observa respuesta quimiotáctica en espermatozoides capacitados *in vitro*.
2. La progesterona tanto a dosis bajas (100 pM) como altas (1 μ M) es capaz de desencadenar una respuesta quimiotáctica en espermatozoides ovinos capacitados *in vitro*.
3. La melatonina tanto a dosis bajas (100 pM) como altas (1 μ M) aumenta el índice quimiotáctico en espermatozoides ovinos capacitados *in vitro* con agentes elevadores del AMPc.
4. El estradiol no ejerce quimioatracción sobre los espermatozoides ovinos.
5. Los resultados sugieren que la cámara Ibidi es más apropiada que la cámara Dunn para el estudio de la quimiotaxis en espermatozoides ovinos.

CONCLUSIONS

The conclusions obtained from this study, based on the results achieved, are:

1. Chemotactic response is only observed in capacitated spermatozoa.
2. Progesterone at both low (100 pM) and high (1 μ M) doses activate chemotactic mechanisms in capacitated ram sperm.
3. Melatonin at both low (100 pM) and high (1 μ M) concentration increases the chemotactic index in *in vitro* capacitated ram sperm with cAMP elevating agents.
4. Estradiol does not produce chemoattraction on ram sperm.
5. The results suggest that Ibidi chamber is more appropriate than Dunn chamber for chemotaxis studies in ram sperm.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Gadella BM (2008). "Sperm membrane physiology and relevance for fertilization". *Anim Reprod Sci*; 107(3–4):229–36.
2. Baldi E. (1996). "Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction Role of calcium protein phosphorylation and lipid remodelling pathways". *Front Biosci*; 1(4):A125.
3. Grasa P, *et al.* (2006). "Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation". *Reproduction*; 132(5):721–32.
4. Visconti PE, *et al.* (1998). "The Molecular Basis of Sperm Capacitation". *J Androl*; 19(2):242–8.
5. Suarez SS (1996). "Hyperactivated Motility in Sperm". *Artic J Androl*.
6. Neill JM, *et al.* (1987). "A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required". *Gamete Res*; 18(2):121–40.
7. Yanagimachi R. (1994). "Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity". *Zygote*; 2(4):371–2.
8. Visconti PE, *et al.* (2002). "Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity". *J Reprod Immunol*; 53(1–2):133–50.
9. Naresh S, *et al.* (2015). "The protein tyrosine phosphorylation during in vitro capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa". *Cryobiology*; 70(3):211–6.
10. Breitbart H. (2002). "Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction". *Mol Cell Endocrinol*; 187(1–2):139–44.
11. Ho H-C, Suarez SS. (2001). "Hyperactivation of mammalian spermatozoa: Function and regulation".
12. Eisenbach M, Giojalas LC (2006). "Sperm guidance in mammals — an unpaved road to the egg". *Nat Rev Mol Cell Biol*; 7(4):276–85.
13. Perez-Cerezales S, *et al.* (2015). "Behavioral mechanisms of mammalian sperm guidance". *Asian J Androl*; 17(4):628–32.
14. Kaupp UB, *et al.* (2008). "Mechanisms of Sperm Chemotaxis". *Annu Rev Physiol*; 70(1):93–117.
15. Schwartz R, *et al.* (1958). "Evidence of Chemotaxis as a Factor in Sperm Motility". *Fertil Steril*; 9(4):300–8.
16. Sun F, *et al.* (2005). "Human sperm chemotaxis: both the oocyte and its surrounding cumulus cells secrete sperm chemoattractants". *Hum Reprod*; 20(3):761–7.
17. Teves ME, *et al.* (2006). "Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa". *Fertil Steril*; 86(3):745–9.
18. Anderson RA, *et al.* (1995). "Atrial natriuretic peptide: A chemoattractant of human spermatozoa by a guanylate cyclase-dependent pathway". *Mol Reprod Dev*; 40(3):371–8.
19. Schall TJ, *et al.* (1990). "Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES". *Nature*; 347(6294):669–71.
20. Wang, Y., *et al.* (2001). "Effects of follicular fluid and steroid hormones on chemotaxis and motility of human spermatozoa in vitro". *Gynecol Endocrinol*; 15(4):286–92.
21. De Amicis, F., *et al.* (2011). "Conventional progesterone receptors (PR) B and PRA are expressed in human spermatozoa and may be involved in the pathophysiology of varicocoele: a role for progesterone in metabolism". *Int J Androl*; 34(5 Pt 1):430–45.

22. Cheng, F.P., *et al.* (1998). "Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor". *Biol Reprod*; 59(4):733-42.
23. Rago, V., *et al.* (2014). "Identification of G protein-coupled estrogen receptor in human and pig spermatozoa". *J Anat.* 224(6):732-6.
24. S Gimeno-Martos, *et al.* (2017). "Steroid hormone receptors and direct effects of steroid hormones on ram spermatozoa"; 154(4):469–81.
25. Baldi, E., *et al.* (2009). "Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions". *Mol Cell Endocrinol.* 308(1-2):39-46.
26. Vigil, P., *et al.* (2008). "Physiological action of oestradiol on the acrosome reaction in human spermatozoa". *Andrologia*, 2008. 40(3):146-51.
27. Guido C, *et al.* (2011). "Human sperm physiology: Estrogen receptor alpha (ER α) and estrogen receptor beta (ER β) influence sperm metabolism and may be involved in the pathophysiology of varicocele-associated male infertility". *J Cell Physiol*; 226(12):3403–12.
28. Śliwa L. (1995). "Effect of some sex steroid hormones on human spermatozoa migration in vitro". *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*; 58(2):173–5.
29. Malpoux B, *et al.* (1999). "Melatonin and the seasonal control of reproduction". *Reprod. Nutr. Dev*; 39:355–366
30. Rosa HJ., Bryant M. (2003). "Seasonality of reproduction in sheep". *Small Rumin Res.*; 48(3):155–71.
31. Gonzalez-Arto M, *et al.* (2016). "Evidence of melatonin synthesis in the ram reproductive tract". *Andrology*; 4(1):163–71.
32. Casao A, *et al.* (2010). "Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate". *J Pineal Res.*; 48(1):39–46.
33. Brzezinski A, *et al.* (1987). "Melatonin in Human Preovulatory Follicular Fluid*". *J Clin Endocrinol Metab.*; 64(4):865–7.
34. Casao A, *et al.* (2013). "The effect of exogenous melatonin during the non-reproductive season on the seminal plasma hormonal profile and the antioxidant defence system of Rasa Aragonesa rams". *Anim Reprod Sci.*; 138(3–4):168–74.
35. Casao A, *et al.* (2012). "Identification and immunolocalisation of melatonin MT1 and MT2 receptors in Rasa Aragonesa ram spermatozoa". *Reprod Fertil Dev.*; 24(7):953.
36. Gimeno-Martos S, *et al.* (2019). "Melatonin reduces cAMP-stimulated capacitation of ram spermatozoa". *Reprod Fertil Dev.*; 31(2):420.
37. Peña, C., *et al.* (2007). "Chemotactic effect of melatonin on leukocytes." *Journal of pineal research.*; 43(3), 263-269.
38. Shirakawa, H., & Ogino, N. (1987) "Novel activity of melatonin. Its chemotactic effect on retinal pigment epithelial cells." *Ophthalmic research*; 19(4), 226-229.
39. Boyden S. (1962). "The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes". *J Exp Med.*; 115(3):453–66.
40. Postlethwaite AE, *et al.* (1976). "The chemotactic attraction of human fibroblasts to a lymphocyte-derived factor". *J Exp Med.*; 144(5):1188–203.
41. Zigmond SH, Hirsch JG (1973). "Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation, and demonstration of a cell-derived chemotactic factor". *J Exp Med.*; 137(2):387–410.

42. Nelson RD, *et al.* (1975). "Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes". *J Immunol*; 115(6):1650–6.
43. Zigmond SH. (1977). "Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors". *J Cell Biol.*; 75(2 Pt 1):606–16.
44. Zicha D, *et al.* (1991). "A new direct-viewing chemotaxis chamber". *J Cell Sci.*; 99(4).
45. Chang H, *et al.* (2013). "Different Migration Patterns of Sea Urchin and Mouse Sperm Revealed by a Microfluidic Chemotaxis Device". Scarfi MR, editor. *PLoS One*; 8(4):e60587.
46. Armon L, *et al.* (2011). "Behavioral Mechanism during Human Sperm Chemotaxis: Involvement of Hyperactivation". Humphries S, editor. *PLoS One*; 6(12):e28359.
47. Bohmer, *et al.* (2005). "Ca²⁺ spikes in the flagellum control chemotactic behavior of sperm". *The EMBO Journal*, 24, 2741–2752.
48. Cosson, M. P., *et al.* (1984). "Sperm chemotaxis in siphonophores. II. Calcium-dependent asymmetrical movement of spermatozoa induced by the attractant". *Journal of Cell Science*, 68, 163–181.
49. Guerrero, A., *et al.* (2010). "Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing. *Developmental Biology*", 344, 52–65.
50. Eisenbach M. (1999). "Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation". *Dev Genet*; 25(2):87–94.
51. Fukuda, N., *et al.* (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, 5835–5845.
52. Burnett, L. A., *et al.* (2011). "Two types of assays for detecting frog sperm chemoattraction". *Journal of Visualized Experiments*, (58), e3407.
53. Hirohashi, N., *et al.* (2013). "Sperm from sneaker male squids exhibit chemotactic swarming to CO₂". *Current Biology*, 23, 1–7.
54. Crenshaw, H. C. (1993). "Orientation by helical motion-III. Microorganisms can orient to stimuli by changing the direction of their rotational velocity". *Bulletin of Mathematical Biology*, 55, 231–255.
55. Riffell, J. A., *et al.* (2002). "Fertilization in the sea: The chemical identity of an abalone sperm attractant". *The Journal of Experimental Biology*, 205, 1439–1450.
56. Gakamsky, A., *et al.* (2008). "Analysis of chemotaxis when the fraction of responsive cells is small—Application to mammalian sperm guidance". *The International Journal of Developmental Biology*, 52, 481–487
57. Yoshida, M., *et al.* (2002). "A chemoattractant for ascidian spermatozoa is a sulfated steroid". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 14831–14836.
58. Ramírez-Gómez, H. V, *et al.* (2018). "Sperm chemotaxis is driven by the slope of the chemoattractant concentration field". *bioRxiv*.
59. R Core Team, (2016). *R: A language and environment for statistical computing*, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
60. Miller RL. (1985). "Demonstration of sperm chemotaxis in Echinodermata: Asteroidea, Holothuroidea, Ophiuroidea". *J Exp Zool*; 234(3):383–414.
61. Alquézar-Baeta C, *et al.* (2019). "OpenCASA: A new open-source and scalable tool for sperm quality analysis". Olson SD, editor. *PLOS Comput Biol*; 15(1):e1006691.

62. Ollero, *et al* (1996). "Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations." *International Journal of Andrology* 19(5): 287-292.
63. Álvarez, J. G., *et al.* (1993). "Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime." *Human Reproduction*, 8(7), 1087-1092.
64. García-López, N., *et al.* (1996). "A dextran swim-up procedure for separation of highly motile and viable ram spermatozoa from seminal plasma." *Theriogenology*, 46(1), 141-151.
65. Colas, C., James, P., Howes, L., Jones, R., Cebrian-Perez, J. A. and Muino-Blanco, T. (2008). "Cyclic-AMP initiates protein tyrosine phosphorylation independent of cholesterol efflux during ram sperm capacitation." *Reprod Fertil Dev* 20(6): 649-658.
66. Harrison, R. A. and Vickers, S. E. (1990). "Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa." *J Reprod Fertil* 88(1): 343-352.
67. Ward, C. R. and Storey, B. T. (1984). "Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay." *Dev Biol* **104**(2): 287-296.
68. Tomasova L, *et al.* (2019). "Advanced 2D/3D cell migration assay for faster evaluation of chemotaxis of slow-moving cells". Buday L, editor. *PLoS One*; 14(7):e0219708.
69. Armon L, *et al.* (2012). "Testing Human Sperm Chemotaxis: How to Detect Biased Motion in Population Assays". Scalas E, editor. *PLoS One*; 7(3):e32909.