



Trabajo Fin de Grado

Efecto del fluido folicular en la quimiotaxis espermática
ovina en función del momento del ciclo estral

Effect of follicular fluid on ovine sperm chemotaxis
depending on the estrous cycle phase

Autor

Adrián Arribas Vinuesa

Directoras

Rosaura Pérez-Pe

Adriana Casao Gascón

Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Curso 2019-2020 – Grado en Biotecnología

BIOFITER Zaragoza (Biología, Fisiología y Tecnologías de la Reproducción).

ÍNDICE

1	RESUMEN	1
2	ABSTRACT	2
3	INTRODUCCIÓN	3
3.1	Procesos sufridos por el espermatozoide en el tracto reproductor femenino	3
3.1.1	Capacitación espermática	3
3.1.2	Hiperactivación flagelar	3
3.1.3	Unión a zona pelúcida y reacción acrosómica – Fecundación	4
3.2	Fluido folicular y su composición.....	5
3.3	Quimiotaxis espermática	5
3.3.1	Posibles agentes quimiotácticos presentes en el fluido folicular	6
3.3.2	Métodos de estudio de quimiotaxis.....	7
4	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	9
5	MATERIALES Y MÉTODOS	10
5.1	Obtención de muestras espermáticas	10
5.2	Obtención de muestras de fluido folicular	10
5.3	Selección espermática: método de “Swim-Up Dextrano”	10
5.4	Cálculo de la concentración de la muestra	12
5.5	Inducción de capacitación “ <i>in vitro</i> ”	12
5.6	Evaluación de muestras espermáticas.....	13
5.6.1	Valoración de la motilidad espermática.....	13
5.6.2	Estudio de la viabilidad	13
5.6.3	Análisis del estado de capacitación: tinción con clorotetraciclina (CTC).....	15
5.7	Análisis de quimiotaxis	16
5.7.1	Preparación de muestras y carga en la cámara de quimiotaxis	16
5.7.2	Análisis de quimiotaxis mediante el software OpenCasa – Índice quimiotáctico (Ch_{Index}).....	17
5.8	Análisis estadísticos	17
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
6.1	Análisis del estado de las muestras espermáticas	18
6.1.1	Motilidad	18
6.1.2	Viabilidad (integridad de membrana)	19
6.1.3	Estado de capacitación.....	19
6.2	Estudio del posible efecto quimioatrayente del fluido folicular sobre los espermatozoides ovinos.....	20
7	CONCLUSIONES	23
8	CONCLUSIONS	23
9	BIBLIOGRAFÍA	24

1 RESUMEN

El fluido folicular conforma el entorno bioquímico en el que se desarrolla el ovocito previo a su ovulación. Contiene hormonas, iones, metabolitos y factores de crecimiento entre otros muchos compuestos, cuya concentración varía a lo largo del ciclo reproductivo estral. Alguno de estos compuestos podría estar involucrado en la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides, mediante la cual serían guiados hacia el ovocito para que se produzca la fecundación. Otro requisito fundamental para la fecundación es la capacitación, conjunto de cambios moleculares y bioquímicos que sufre el espermatozoide y le confieren capacidad fecundante.

En estudios realizados en ratón y humano, se ha descrito que el fluido folicular ejerce una acción quimioatrayente para los espermatozoides, pero hasta el momento no existe ningún estudio en la especie ovina. Por ello, el objetivo central de este trabajo consistió en estudiar la capacidad quimiotáctica del fluido folicular de la oveja sobre los espermatozoides ovinos.

Teniendo en cuenta la composición variable de dicho fluido a lo largo del ciclo estral, se ensayaron fluidos foliculares obtenidos de dos momentos distintos del ciclo: en fase folicular temprana (proestro) y luteal temprana (metaestro), ambos a concentraciones de 2% y 10% (v/v). Dado que algunos estudios apuntan a que sólo los espermatozoides capacitados son capaces de responder ante un agente quimiotáctico, en este estudio se usaron tanto espermatozoides sin capacitar, como capacitados *in vitro* en presencia o ausencia de agentes elevadores de AMPc (*cocktail* y control, respectivamente). Tras la valoración previa del estado de los espermatozoides (motilidad, viabilidad y estado de capacitación), se realizaron los ensayos de quimiotaxis utilizando cámaras IBIDI® μ -Slide Chemotaxis, y se analizaron mediante el software de acceso libre OpenCASA, que proporciona un valor de índice quimiotáctico.

Los resultados obtenidos demuestran que el fluido folicular, tanto obtenido en fase folicular como luteal temprana, ejerce una acción quimiotáctica a ambas concentraciones ensayadas, atrayendo hacia sí, de una manera significativa, únicamente a los espermatozoides capacitados *in vitro*. Se puede afirmar por ello, que el fluido folicular actúa como quimioatrayente espermático en la especie ovina.

2 ABSTRACT

Follicular fluid is the biochemical environment in which oocytes develop before ovulation. It contains hormones, ions, metabolites, growth factors and some other compounds which concentration vary along the oestral reproductive cycle. Some of these compounds may be involved in spermatoc chemotactic response, which guides spermatozoa towards the oocyte for producing fertilization. Other main requirement for fertilization is capacitation, in which spermatozoa suffer molecular and biochemical changes necessary for acquire fertilizing ability.

Follicular fluid has a chemotactic effect on mouse and human spermatozoa, but, so far, this effect has not been demonstrated in ram sperm. Thus, the main objective of this work was to evaluate the follicular fluid chemotactic effect on ram spermatozoa.

The composition of follicular fluid varies along the reproductive cycle. Thus, we evaluated ewe follicular fluid obtained from two different stages of oestrus cycle, early follicular phase (proestrus) and early luteal phase (metaestrus), both at 2% and 10% (v/v) concentrations. Previous studies had concluded that only capacitated spermatozoa show response towards chemotactic compounds, so in this study were used not only *swim-up* selected spermatozoa (non-capacitated), but also capacitated spermatozoa *in vitro* in the presence or absence of cAMP rising factors (named *cocktail* and control, respectively). After sperm evaluation (motility, viability and capacitation), chemotactic assays were performed in IBIDI® μ -Slide Chemotaxis chambers, and the results were analyzed by the OpenCASA software, that can calculate the chemotactic index.

Our results demonstrate that both follicular fluids, obtained in early follicular phase and early luteal phase, produce a chemotactic response at both concentrations tested, only on *in vitro* capacitated spermatozoa. In conclusion, follicular fluid is a spermatoc chemoattractant in sheep.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 Procesos sufridos por el espermatozoide en el tracto reproductor femenino

In vivo, los espermatozoides de la especie ovina, así como los de todos los mamíferos euterios, incluido el hombre, necesitan permanecer algunas horas en el tracto reproductor femenino para adquirir la capacidad de fecundar el ovocito, ubicado en el oviducto (1,2). Este potencial que adquiere el espermatozoide para poder realizar la fecundación, conocido en su conjunto como **capacitación**, implica una serie de profundos cambios biofísicos y bioquímicos, la hiperactivación del movimiento de los mismos y la reacción acrosómica, previos a la unión con el gameto femenino (3).

3.1.1 Capacitación espermática

Tras la cópula o inseminación artificial, los espermatozoides atraviesan el útero y llegan al istmo del oviducto, donde quedan depositados en los reservorios, que son plegamientos epiteliales de la mucosa que caracterizan a este órgano. Aquí es donde los espermatozoides pierden los factores decapacitantes, entre los que encontramos los mucopolisacáridos y proteínas aportadas por las glándulas sexuales accesorias en el momento de la eyaculación (3). En este momento comienza el proceso de capacitación espermática, que no llevan a cabo todos los espermatozoides a la vez, sino en oleadas.

Este proceso implica una serie de modificaciones a nivel de membrana plasmática, como la salida de colesterol, un aumento en la concentración de iones intracelulares, especialmente el calcio y el bicarbonato (3) y el aumento en la fosforilación de proteínas y actividad de la proteína quinasa (4), que inducirá los procesos de hiperactivación flagelar y reacción acrosómica (5).

La salida de colesterol se relaciona con un aumento de la fluidez de membrana, así como de una redistribución en las proteínas de la misma, lo que facilita el movimiento de iones a través de canales iónicos (6), desembocando en la hiperpolarización de la membrana plasmática espermática. Se fomenta así la activación de la adenilato ciclasa (7), y con ella, la generación de AMPc, que dará lugar a la posterior activación de la proteína quinasa A (PKA). La PKA provocará la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina (5), tanto en el flagelo como en la cabeza, que darán lugar a los procesos de hiperactivación flagelar y reacción acrosómica posteriores (8).

3.1.2 Hiperactivación flagelar

En el tracto reproductor masculino, a su paso por el epidídimo, los espermatozoides van a adquirir la capacidad de activación de batido flagelar, confiriéndoles el movimiento de avance rectilíneo que poseen tras ser eyaculados (9,10). La movilidad espermática es desencadenada por ciertos cambios en el medio iónico extracelular, gracias a la interacción con ligandos específicos (progesterona y esteroide sulfatado SAAF) y glucosa, que se encuentran presentes en el plasma seminal y en el interior del aparato reproductor femenino. La activación del movimiento comienza gracias a estas señales, que activarán ciclasas y aumentará, en consecuencia, la concentración de nucleótidos cíclicos (AMPc, GMPc) (3). Este patrón de movimiento, que se denomina motilidad

activada, va a cambiar durante la capacitación, dando lugar a una motilidad hiperactivada, que le permitirá atravesar con éxito las células del *cúmulus* que rodean al ovocito (9,10). Para ello, se abrirán los canales de K^+ dependientes de GMPc, provocando la consecuente salida de este ion y la hiperpolarización de la membrana espermática. Esto inducirá una alcalinización del citosol vía intercambiador voltaje dependiente Na^+/H^+ (saldrá H^+) (3), activando así los canales CATSPER de Ca^{++} , que provocarán la entrada de este ion al interior del espermatozoide (9). Este proceso en su conjunto provocará la activación de las dineínas, que son las principales proteínas motoras dependientes de ATP, presentes en el flagelo espermático (3).

Esta motilidad “activada” en línea recta, contrasta con la motilidad “hiperactivada” que se ha descrito en los espermatozoides que están en el proceso de fecundación. Este último tipo de movimiento se caracteriza por un batido del flagelo amplio y asimétrico, de una forma vigorosa pero con baja frecuencia de batida (10), un movimiento amplio de la cabeza y un desplazamiento curvilíneo (11). El cambio de patrón de nado en el espermatozoide es esencial para que se dé la fertilización, ya que ayuda a este a superar el conducto mucoso que forma el oviducto, escapar de los reservorios de espermatozoides y a penetrar la matriz del *cúmulus* y zona pelúcida de los ovocitos que tratan de fecundar

Existe evidencia científica de que el ion Ca^{++} está estrechamente relacionado con los procesos de hiperactivación espermática y de quimiotaxis. Se ha visto que en algunas especies puede existir una modulación de la hiperactivación para conseguir de alguna forma transformar esos movimientos asimétricos propios de la hiperactivación a movimientos controlados y modulados, dirigidos hacia el quimioatrayente (9). Esto se debería a que la localización de canales regulables para nucleótidos cíclicos está distribuida, además de en el cuerpo, a lo largo del flagelo de los espermatozoides, permitiendo así una entrada más controlada de calcio, desembocando en un movimiento flagelar regulado que dará la quimiotaxis (10).

3.1.3 Unión a zona pelúcida y reacción acrosómica – Fecundación

La zona pelúcida del ovocito expone glicoproteínas de reconocimiento, que interaccionarán con la membrana espermática, ya sea en una interacción proteína-proteína, o carbohidrato-proteína. Globalmente, la reacción acrosómica se da *in vivo* cuando se produce la interacción entre ambos gametos, siendo este proceso específico de especie, y culminando en la fusión de la membrana citoplasmática con la acrosomal externa, ambas localizadas en la cabeza del espermatozoide, en un proceso que implica una cascada de transducción de señal calcio dependiente. Además, la reacción acrosómica también puede darse de forma espontánea y resulta posible inducirla *in vitro* (3,11).

Tras la reacción acrosómica, el espermatozoide es capaz de atravesar la zona pelúcida y alcanzar el espacio perivitelino del ovocito, momento en el que se suceden mecanismos para evitar la poliespermia, como el cambio de potencial en la membrana del ovocito y la reestructuración de la zona pelúcida gracias a la exocitosis del contenido enzimático localizado en los gránulos del espacio perivitelino (3).

Tras este proceso, se produce la adhesión del espermatozoide y la fusión de membranas del espermatozoide y el ovocito (3), completando el proceso de **fecundación**.

3.2 Fluido folicular y su composición

El fluido folicular conforma el entorno bioquímico en el que se desarrolla el ovocito previamente a su ovulación. Está constituido, por una parte, por exudados del suero sanguíneo, y por otra de sustancias producidas localmente y relacionadas con la actividad metabólica de las células foliculares. Dado que esta actividad varía durante los distintos estadios de desarrollo folicular, la composición bioquímica de este fluido también es variable a lo largo del ciclo estral (12).

En general, el fluido folicular se considera un medio no definido en cuanto a sus componentes, aunque se han llevado a cabo estudios por los cuales se han encontrado concentraciones variables de hormonas, como los estrógenos (estradiol 17β), progesterona, testosterona (13), inhibina (14) y melatonina (15). A su vez, también se han encontrado iones (sodio, potasio, cloruro), y metabolitos como glucosa, β -hidroxibutirato, lactato, urea, proteínas totales, albúmina, ácidos grasos sin esterificar, colesterol total (12,16), factores de crecimiento y factores de tipo olfatorio y odorante producidos por el ovocito, posiblemente para inducir la quimiotaxis (3,17).

3.3 Quimiotaxis espermática

La quimiotaxis se define como un cambio de patrón de desplazamiento de una célula en presencia de una sustancia quimiotáctica. Esta respuesta puede ser de atracción o de repulsión (17), en función de las características de la sustancia o su entorno bioquímico.

En el mundo animal, parece existir una comunicación quimiotáctica entre el espermatozoide y el ovocito antes de contactar físicamente entre ellos. En especies no mamíferas, estas interacciones quimiotácticas están muy estudiadas y documentadas, al contrario de lo que ocurre en mamíferos (18), donde sólo se ha descrito en humano y en ratón (18). El grupo de investigación en el que se ha desarrollado este TFG, ha presentado resultados preliminares que demuestran, por primera vez, una acción quimioatrayente de determinadas hormonas presentes en el tracto reproductor femenino, sobre los espermatozoides ovinos (19).

Mientras que en especies no mamíferas la quimiotaxis espermática tiene como fin el atraer el número máximo de espermatozoides al ovocito, en mamíferos como la especie ovina, su objetivo es el reclutamiento de una población seleccionada de espermatozoides que han sido previamente capacitados (18). Diversos estudios han demostrado que los espermatozoides de mamífero que no han sido capacitados, no presentan respuesta quimiotáctica (19), y que de existir, sería menos acusada o debida al azar. Este hecho ha generado cierta controversia ya que, para que un espermatozoide se considere capacitado, ha tenido que sufrir el proceso de hiperactivación flagelar, que se caracteriza por un movimiento amplio, asimétrico y curvilíneo; características que distan de las que debe tener un espermatozoide para seguir una ruta quimiotáctica. Por ello se ha propuesto que el proceso de hiperactivación se daría de manera intermitente, para poder localizar el gradiente de concentración del agente quimioatrayente en caso de alejarse de él, y una vez detectado, el espermatozoide volvería al movimiento lineal y simétrico para poder llegar hasta el ovocito (9).

Todo ello, sumado a que también se postula la existencia de otros mecanismos de movimiento guiado como la termotaxis (en función de un gradiente de temperatura) y la reotaxis

(en contra del flujo de un fluido), hace complejo y dificultoso este tipo de estudios en mamíferos (17).

3.3.1 Posibles agentes quimiotácticos presentes en el fluido folicular

Entre los constituyentes del fluido folicular que podrían jugar un papel en la quimiotaxis espermática, se encontrarían las hormonas esteroideas, la melatonina y otros compuestos como factores odorantes.

Con respecto a las hormonas esteroideas, el grupo de investigación donde se ha desarrollado este TFG, demostró recientemente la existencia de receptores de membrana en los espermatozoides ovinos para el 17- β estradiol y la progesterona, y que dichos receptores cambian de localización durante el proceso de capacitación *in vitro*. La unión a los mismos da lugar a efectos rápidos (no genómicos) sobre la funcionalidad espermática ovina (20). Ambas hormonas han demostrado estar relacionadas con los procesos de hiperactivación, capacitación y reacción acrosómica, y por tanto, con la capacidad fecundante (21). Hace un poco más de una década, quedó confirmada la acción quimioatrayente de la progesterona en espermatozoides humanos (22) y de conejo (23). Recientemente, en 2017, se demostró por primera vez que, tanto la progesterona como el 17- β estradiol también tenían efectos quimiotácticos para el espermatozoide ovino (19). Sin embargo, los estudios con fluido folicular completo son escasos y no se han realizado hasta el momento en la especie ovina, aunque sí que se ha reportado cierta quimiotaxis espermática hacia este fluido en espermatozoides de ratón y humano (24,25).

La melatonina es una hormona de tipo indoleamina derivada del triptófano que media muchos procesos fisiológicos, endocrinos y de comportamiento, ya sea en la regulación del sueño, la reproducción estacional, la respuesta inmune y el envejecimiento en vertebrados (26). Es de localización ubicua en el organismo y está presente en una amplia variedad de especies. Se produce en la glándula pineal, aunque también puede ser sintetizada en otros tejidos como los del tracto gastrointestinal, ojo, médula ósea, piel y fluidos foliculares (27)(28). Resulta llamativo que en el caso de estos tejidos extrapineales, incluido el fluido folicular, la concentración de esta hormona puede ser superior a la descrita en el propio suero sanguíneo (29). De esta forma, los espermatozoides se van a ver expuestos a un gradiente de concentración de melatonina en su paso por el tracto reproductor femenino. En el espermatozoide ovino, nuestro grupo de investigación describió la presencia de receptores de membrana para esta hormona (MT1 y MT2) (27), y un efecto dosis-dependiente sobre la capacitación espermática, promoviéndola a concentraciones picomolares e inhibiéndola a concentraciones micromolares. Además, la melatonina también es capaz de revertir los efectos de la apoptosis y el estrés oxidativo (30), mejorando la motilidad y la funcionalidad espermática (31,32).

En cuanto a su capacidad quimiotáctica, se han publicado resultados sobre leucocitos (neutrófilos) a concentraciones de entre 40 μ M y 1.2 pM (33). En cuanto a su acción quimioatrayente sobre espermatozoides, sólo se tiene conocimiento de los estudios preliminares realizados por nuestro grupo de investigación sobre espermatozoides ovinos (34) y recogidos en un TFG defendido el año pasado.

Los factores odorantes poseen receptores expresados en variedad de tejidos aparte de en el epitelio respiratorio. Así, transcritos de estos receptores, en concreto del receptor hHOR17-4, se han identificado en espermatozoides (17). Estos factores, también presentes en el fluido folicular, han demostrado que pueden producir quimiotaxis espermática a través de una vía de

transducción de señal mediada por la señalización del cAMP, todavía no muy conocida y que presenta ciertas incógnitas (17).

3.3.2 Métodos de estudio de quimiotaxis

A lo largo de los años se han utilizado principalmente 4 tipos de cámaras para el estudio de quimiotaxis, que ordenadas de más antigua a más moderna serían: *cámara Boyden*, *cámara Zigmond*, *cámara Dunn* y *cámara ibidi μ -Slide Chemotaxis* (Figura 3.1).

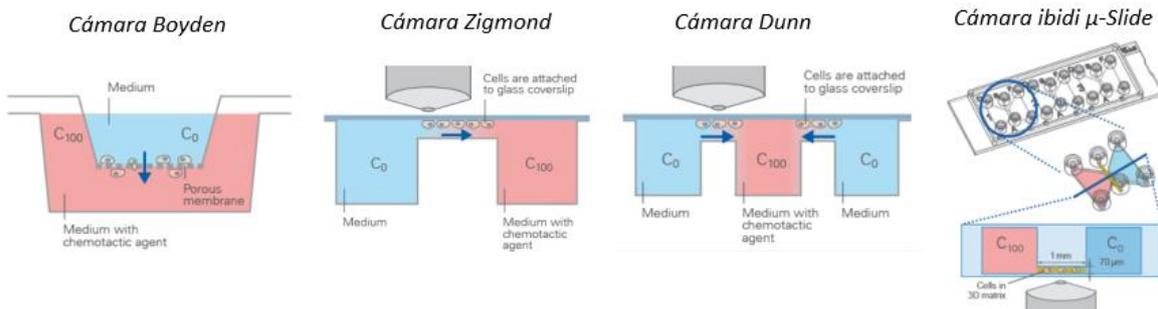


Figura 3.1. Representación gráfica de los principales dispositivos de quimiotaxis. De izquierda a derecha: cámara *Boyden*, cámara *Zigmond*, cámara *Dunn* y cámara *ibidi μ -Slide Chemotaxis* (35).

La cámara *Boyden* es la primera que se utilizó, y se basa en la migración celular de un lado a otro de una membrana porosa o filtro. No es posible analizar trayectorias, ya que se realiza un recuento de células en la membrana y no se analiza de forma continua. El gradiente químico establecido es escalonado y hay una distribución celular no homogénea al comenzar el ensayo (35). Hay registros de 1962 en los que se utilizó para el estudio de quimiotaxis en leucocitos (36).

En la cámara *Zigmond*, las células migran y crecen en un cristal de cobertura situado en el “puente” que une dos reservorios. Existe un gradiente químico lineal establecido, pero no mantiene condiciones de estabilidad a largo plazo. La distribución celular es homogénea al comenzar el ensayo (35). En 1997, se utilizó en un ensayo de quimiotaxis hacia gradientes químicos en leucocitos polimorfonucleares (37).

La cámara *Dunn* evolucionó de la cámara *Zigmond* y tiene una construcción similar, pero consiguiendo una mayor precisión dimensional y estabilidad a largo plazo (35). Consiste en un portaobjetos de cristal con dos pocillos concéntricos en su interior, y separados por un “puente” de 1 mm de ancho. Han sido utilizadas para estudios celulares en los que la precisión era clave, como en los fibroblastos (38).

Finalmente apareció la cámara *IBIDI® μ -Slide Chemotaxis* en 2005, en la que se estudia la migración celular, ya sea de células rápidas o lentas, como adherentes o no adherentes, a través de un “puente” que conecta sendos reservorios celulares. Se mantiene un gradiente químico lineal a largo plazo. Permite análisis detallados de migración celular (35). Este tipo de cámaras se han usado para ensayos quimiotácticos en respuesta a gradiente químico principalmente con células con migración lenta, como pueden ser fibroblastos, células inmunitarias o células cancerosas. Sin embargo, más recientemente se han utilizado para analizar células de migración

rápida como pueden ser los espermatozoides (39). En un TFG desarrollado en este mismo grupo de investigación y defendido recientemente, quedó demostrado que esta cámara resultaba más adecuada para estudios de quimiotaxis espermática que la cámara *Dunn*, por lo que es la que se ha utilizado a tal efecto en este trabajo.

A día de hoy, el análisis de datos obtenidos mediante grabaciones en estas cámaras de quimiotaxis es más sencillo de lo que era al principio, gracias al desarrollo de programas o herramientas informáticas específicas para ello. El grupo de investigación donde se ha llevado a cabo este TFG, diseñó recientemente un software libre llamado *OpenCasa* (40), el cual, además de analizar los parámetros típicos de calidad seminal (motilidad, morfología y viabilidad) es capaz de proporcionar información sobre el comportamiento quimiotáctico, analizando ángulos de desplazamiento instantáneo de espermatozoides individuales, con los que obtiene el llamado índice quimiotáctico (Ch_{index}), que es una medida de cuantificación de la quimiotaxis espermática, ya sea de atracción o repulsión.

4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Existen muchos estudios quimiotácticos en células somáticas, pero los datos existentes de quimiotaxis espermática en mamíferos son escasos. Aunque hay trabajos que sugieren que ciertos componentes presentes en el fluido folicular, de manera individual, actúan como quimioatrayentes para los espermatozoides (19), únicamente se ha demostrado cierta quimiotaxis espermática hacia el fluido folicular completo en unas pocas especies, entre las que no se incluye la ovina, objeto de este estudio (24,25). Además, hay autores que aseguran que únicamente los espermatozoides que han sido capacitados previamente, ya sea *in vivo* o *in vitro*, tienen capacidad para poder responder ante un gradiente quimiotáctico (19).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, la hipótesis planteada en este trabajo fue que el fluido folicular completo podría generar una respuesta quimiotáctica de atracción por parte de los espermatozoides en función de su estado de capacitación, y que esta capacidad del fluido folicular podría depender de la fase del ciclo estral durante la que se ha recogido y la concentración a la que se utiliza.

Por todo ello, en este trabajo se plantean varios objetivos:

1. Estudiar el posible efecto quimiotáctico del fluido folicular ovino, recogido en dos momentos diferentes del ciclo estral: proestro (fase folicular temprana) y metaestro (fase luteal temprana), sobre los espermatozoides ovinos.
2. Determinar el grado de respuesta quimiotáctica en función del estado de capacitación de los espermatozoides ovinos.
3. Evaluar la influencia de la concentración de fluido folicular en la acción quimiotáctica sobre los espermatozoides ovinos.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención de muestras espermáticas

Las muestras seminales empleadas para la realización de los experimentos fueron obtenidas a partir de nueve moruecos adultos de varias edades y de raza *Rasa Aragonesa*, estabulados en las instalaciones de la facultad de Veterinaria (*UniZar*). Los eyaculados usados en este trabajo se obtuvieron de octubre a marzo de 2020, coincidiendo con la época reproductiva del ganado ovino en estas latitudes.

Las extracciones fueron llevadas a cabo por personal del Servicio de apoyo a la experimentación animal (SAEA), mediante vagina artificial. Se trabajó con una mezcla de los segundos eyaculados para evitar diferencias individuales y porque el segundo eyaculado presenta una calidad espermática más homogénea que el primero (41). Las muestras se mantuvieron atemperadas a 37 °C hasta su uso en el laboratorio.

5.2 Obtención de muestras de fluido folicular

Las muestras de fluido folicular usadas en este trabajo fueron cedidas amablemente por el Grupo de Investigación de Fisiología de la Reproducción de la Universidad de Murcia.

Las muestras procedían de varias ovejas y habían sido obtenidas en distintas fases del ciclo estral. Para este trabajo se utilizaron las muestras obtenidas en fase folicular temprana (**FFT**) y fase luteal temprana (**FLT**) (proestro y metaestro, respectivamente), ya que, potencialmente podían presentar mayor variación en su composición, especialmente en su concentración hormonal. Las muestras se mantuvieron congeladas a -80 °C hasta su uso actual.

5.3 Selección espermática: método de “Swim-Up Dextrano”

El semen no está constituido únicamente por espermatozoides, sino también por el plasma seminal procedente en su mayoría de las glándulas sexuales accesorias. Este plasma seminal, a medio-largo plazo ejerce efectos negativos en los parámetros de calidad seminal (41,42), y en concreto en la motilidad y viabilidad, que disminuyen sensiblemente. Además, el plasma seminal incluye en su composición hormonas y otras sustancias que podrían alterar los resultados de este trabajo. Por ello, tras la llegada de la muestra fresca al laboratorio, se hace imprescindible separar a los espermatozoides del plasma seminal. En este caso se utilizó el método del *swim-up/dextrano*. Esta técnica se desarrolló para evitar los daños subletales que causaba la centrifugación (42), y nuestro grupo de investigación la adaptó para espermatozoides ovinos (41).

El *swim-up/ dextrano* es, además de un método de lavado, una técnica de selección, ya que permite obtener una muestra enriquecida en espermatozoides con alta viabilidad y motilidad. Sólo los espermatozoides con buena motilidad son capaces de nadar y atravesar la capa rica en dextrano que se deposita sobre ellos. Además, los espermatozoides con la membrana alterada quedan retenidos en esta capa. Por ello, en la capa de recogida encontraremos una mayor proporción de espermatozoides móviles, viables y, además, libres de plasma seminal (Figura 5.1).

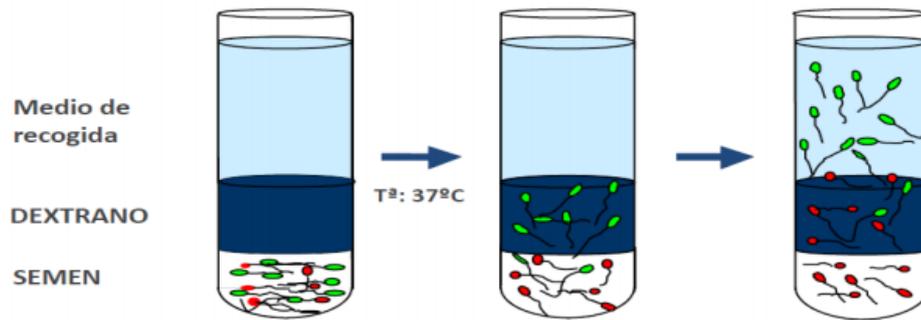


Figura 5.1. Representación gráfica de la técnica *swim-up/dextrano*. En verde los espermatozoides viables; en rojo los no viables.

El medio utilizado para llevar a cabo esta técnica es el mHTF (*modified Human Tubular Fluid Medium*) adaptado en este caso a la especie ovina (42), con la composición indicada en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Tabla composición del medio mHTF para *swim-up/dextrano*

COMPONENTES MEDIO mHTF			
Compuesto	Concentración	Compuesto	Concentración
NaCl	50 mM	Sacarosa	0.2 M
KCl	10 mM	HEPES (tampón)	21 mM
MgSO ₄ (anhidro)	0.4 mM	Lactato sódico	18.6 mM
K ₂ HPO ₄	0.3 mM	Glucosa	2.8 mM
		Piruvato sódico	0.3 mM

Para esta técnica, a partir del mHTF, se prepararon otros 2 medios: mHTF-A (5 mg/mL de albúmina sérica bovina, BSA, que evita la aglutinación de espermatozoides), y mHTF-dextrano (30 mg/mL de dextrano)).

El proceso comienza depositando suavemente con ayuda de una micropipeta, gota a gota, 500 μ L de semen fresco en la base un tubo de ensayo con base redondeada, sobre el que se depositan 500 μ L de mHTF-dextrano, teniendo cuidado de que no se mezclen las fases. Para finalizar, se depositan encima de lo anterior 1500 μ L de mHTF-A, que será la fase acuosa superior, donde se llevarán a cabo las recogidas de espermatozoides óptimos, en lapsos de 15 minutos, siempre incubando el tubo dentro de una estufa a 37 °C. Tras recoger con una micropipeta cada uno de los sobrenadantes de 750 μ L, se renueva ese volumen con mHTF-A, hasta completar las 4 recogidas necesarias (la primera se descarta por poder contener restos de plasma seminal). Tras el proceso de recogida, homogeneizaremos el nuevo tubo donde hemos ido almacenando la muestra de espermatozoides *swim-up* seleccionados.

5.4 Cálculo de la concentración de la muestra

La concentración espermática se calculó mediante la cámara Neubauer. En concreto, para contar espermatozoides, se utilizaron los 4 recuadros centrales de cada uno de los cuatro cuadrantes, para facilitar los cálculos posteriores. En moruecos, la concentración de espermatozoides en el eyaculado es de $3-7 \times 10^9$ cél/mL.

Como la muestra obtenida por *swim-up* suele estar muy concentrada, se hizo necesaria una dilución 1/100 (v/v) para realizar el recuento. Esta dilución se hizo en H₂O, ya que los espermatozoides quedan inmovilizados y se facilita el proceso de conteo. Una vez diluida la muestra, se introdujeron 8 μ L por capilaridad en la cámara Neubauer con ayuda de una micropipeta. El recuento se llevó a cabo usando un microscopio óptico Nikon eclipse 50i de contraste de fases (Nikon Eclipse 50i; Nikon, Tokyo, Japón), con el objetivo de 10 aumentos (a 100x aumentos totales). Tras el recuento, se calculó la concentración de la muestra seleccionada en células/mL con ayuda de la siguiente expresión:

$$\text{Concentración (cél./ mL)} = n^{\circ} \text{ células contadas} \times 10^4 \times \frac{1}{\text{Dilución}}$$

5.5 Inducción de capacitación “in vitro”

Como se ha comentado en la introducción, la capacitación espermática confiere a los espermatozoides capacidad fecundante, y, según algunos estudios, sólo los espermatozoides capacitados son capaces de responder a un estímulo quimiotáctico (19). Por esta razón, se hizo necesario llevar a cabo una inducción de la capacitación espermática *in vitro*, para poder comparar la respuesta en muestras capacitadas y no capacitadas.

Para la inducción de la capacitación *in vitro*, las muestras obtenidas por *swim-up/dextrano*, se diluyeron hasta una concentración de $1,6 \times 10^8$ células/mL en medio TALP. Este medio está compuesto por 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 y BSA 5mg/mL, pH=7.3. A las muestras incubadas en medio TALP se les denominó *control* o “C”. Este medio se usa para la inducción de la capacitación *in vitro* en numerosas especies, pero, la especie ovina es particularmente difícil de capacitar debido a sus bajos niveles de AMPc. Por ello, el medio TALP fue suplementado con una mezcla o *cocktail* de sustancias que disparan la capacitación en el espermatozoide ovino: db-cAMPc 1 mM, cafeína 1 mM, teofilina 1 mM, ácido okadaico 0,2 μ M (inhibidor de fosfatasa) y metil- β -ciclodextrinas (MCBD) 2,5 mM. A las muestras incubadas en este medio se les denominó *cocktail* o “K”.

Ambos tipos de muestras se incubaron durante dos horas (en tubos *ependorf*® abiertos, agitando suavemente cada hora) en condiciones capacitantes: 39 °C y 5% de CO₂ y 100% de humedad, para simular las condiciones reales en tracto reproductor femenino. Normalmente esta incubación se alarga hasta 3 horas, pero a partir de la tercera hora, los espermatozoides comienzan a aglutinarse, lo que dificulta su movimiento y, por tanto, el estudio de la quimiotaxis.

5.6 Evaluación de muestras espermáticas

Antes de llevar a cabo los ensayos de quimiotaxis, se valoró la motilidad, la integridad de la membrana espermática, y el estado de capacitación, tanto de las muestras *swim-up*, como las capacitadas control y *cocktail*.

5.6.1 Valoración de la motilidad espermática

Para la evaluación de la motilidad se utilizó un sistema de análisis computacional automatizado, que genéricamente se denomina *CASA (Computer Assisted Semen Analysis)*. En concreto se utilizó el sistema ISAS1.0.4 (Proiser S.L., Valencia, España), sincronizado con una cámara de vídeo Basler A312f (Basler Vision Components, Exton, PA, EEUU) instalada a su vez en un microscopio óptico con contraste de fase (Nikon Eclipse 50i; Nikon, Tokyo, Japón), usando el objetivo de 10X (100x aumentos totales) (Figura 5.2). Hay que destacar que el microscopio está equipado con una platina térmica para mantener las muestras a la temperatura óptima mientras se analizan. En cuanto a la preparación de las muestras para este análisis, fue necesario diluir a 3×10^7 células/mL para que el programa fuese capaz de analizar células individuales. Se colocó una gota de unos 10 μ L entre un portaobjetos y un cubreobjetos atemperados a 37 °C y se analizaron 5 campos por cada muestra para obtener un resultado representativo de las mismas. Los parámetros que se analizaron fueron la **motilidad total** (porcentaje de espermatozoides que se mueven) y la **motilidad progresiva** (porcentaje de espermatozoides que se desplazan en una trayectoria rectilínea).



Figura 5.2. Equipos de evaluación espermática del laboratorio del departamento. A la derecha los aparatos utilizados para analizar motilidad, y a la izquierda los necesarios para analizar los ensayos de quimiotaxis. Imagen tomada el 10/03/2020.

5.6.2 Estudio de la viabilidad

La viabilidad, en este contexto se refiere a la **integridad de la membrana plasmática**. Hay varios métodos para analizar la viabilidad, pero en este caso se ha utilizado la tinción con dos fluorocromos distintos: diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) y yoduro de propidio (IP).

El CFDA es un colorante incoloro poco ionizado, por lo que es capaz de penetrar en todas las células. Una vez dentro, es hidrolizado por las esterasas intracelulares, dando lugar a acetato de carboxilfluoresceína, el cual posee fluorescencia verde. Este compuesto posee carga eléctrica, por lo que ya no podrá abandonar la célula en caso de que su membrana esté intacta. Por ello, las células viables con metabolismo activo y membrana intacta aparecen de color verde bajo iluminación fluorescente. Por otro lado, los espermatozoides con membranas dañadas dejan escapar el compuesto fluorescente y no adquieren fluorescencia.

El IP es un colorante nuclear que sólo entra en las células dañadas, uniéndose a su DNA, y tiñendo con fluorescencia roja la cabeza del espermatozoide.

Podemos cuantificar la viabilidad de una muestra celular teñida con CFDA/IP usando un microscopio de fluorescencia o un citómetro de flujo. En este caso se ha utilizado el citómetro de flujo, que hace pasar las células una a una por un canal y un láser incide sobre ellas. La dispersión que generan nos da una idea de su tamaño y forma, además de si son viables o no viables (Figura 5.3).

Para esta tinción, las muestras se diluyeron en medio mHTF (1/60 las de swim-up y 1/30 las capacitadas C y K) y se les añadieron 3 μ L de CFDA (1mM), 4 μ L de IP (1,5 mM) y 3 μ L de formaldehído, que actúa como fijador (0,5 % v/v).

Las muestras se incubaron en estufa a 37 °C, 10 minutos en oscuridad, y se analizaron con citómetro de flujo FC 500 (Beckman Coulter INC., Pasadena, CA, EEUU), que dispone de un láser de argón de 488 nm. En cuanto a los filtros del citómetro, se utilizaron FL1-525 \pm 5 nm y FL4-675 \pm 5 nm, para CFDA e IP, respectivamente. El citómetro evaluó 20.000 eventos (espermatozoides individuales) en cada muestra, clasificándolos en espermatozoides viables (CFDA+/IP-) o no viables (CFDA-/IP+), como se ve gráficamente en la figura 5.3 A.

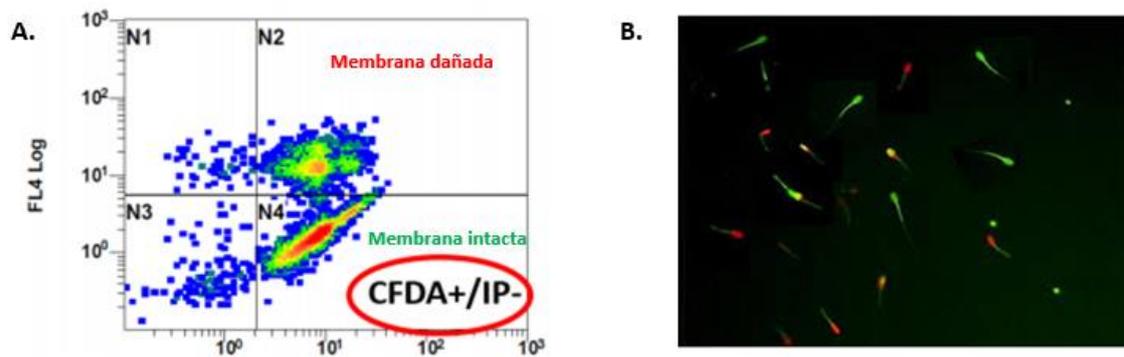


Figura 5.3. A) Imagen representativa de las diferentes poblaciones de espermatozoides obtenidas por citometría de flujo (fotodetectores FL1 y FL4) tras la tinción con CFDA/IP: espermatozoides no viables en el cuadrante superior derecho y los viables en el inferior derecho. **B)** Imagen representativa de la tinción con CFDA/IP evaluada con microscopio óptico de fluorescencia y con filtro de excitación de 450-490 nm. Objetivo 40X. En ella se aprecian los espermatozoides con la membrana intacta teñidos de verde; los que tienen la membrana dañada teñidos de rojo, y en amarillo y rojo a los que tienen la membrana plasmática dañada y la acrosomal intacta. Imágenes tomadas del libro “Manejo reproductivo ovino”.

5.6.3 Análisis del estado de capacitación: tinción con clorotetraciclina (CTC)

La clorotetraciclina (CTC) es un antibiótico capaz de penetrar en las células espermáticas y unirse al calcio intracelular, dando una coloración amarilla fluorescente en los lugares de la célula donde esté presente este catión divalente. Esta técnica se basa en la distribución característica del calcio intracelular a lo largo del proceso de capacitación, por lo que al analizarlo mediante un microscopio de fluorescencia podremos distinguir tres poblaciones celulares, correspondientes con los tres principales estadios de capacitación que pueden darse:

- Espermatozoides no capacitados: cabeza uniformemente fluorescente.
- Espermatozoides capacitados: fluorescencia en la mitad acrosomal de la cabeza, y sin fluorescencia en la mitad más cercana al flagelo.
- Espermatozoides que han sufrido la reacción acrosómica: han perdido la fluorescencia excepto en la franja ecuatorial de la cabeza.

Sin embargo, la capacitación es un proceso continuo, por lo que, para clasificar los espermatozoides en las tres poblaciones posibles, es preferible que siempre lo haga la misma persona, para ganar en rigurosidad y evitar discrepancias de percepción individual. La técnica fue estudiada en ratón (*Mus musculus*), y en 2006 validada en la especie ovina por miembros del grupo de investigación donde se ha realizado este TFG (43,44).

La solución de CTC se preparó cada día, a una concentración de 750 μM de clorotetraciclina (Sigma-Aldrich) diluida en un buffer compuesto por NaCl 130 mM, TRIS 20 mM y DL-cisteína 5 μM , ajustando el pH a 7,8 y filtrándolo con poro de 0,22 μm . Una vez preparada la solución de trabajo de CTC, se homogeneizó durante 30 minutos en un balancín, siempre en oscuridad, y se conservó en nevera hasta su uso. Para la tinción se realizó una mezcla 1:1 (v/v) de las muestras con la solución de tinción CTC (20 μl de cada). Para fijar la preparación, se utilizaron 4 μL de una dilución 1,25 % p/v de paraformaldehído en tampón TRIS-HCl 0,5 M. Las muestras así preparadas se incubaron 30 minutos como mínimo a 4 $^{\circ}\text{C}$, antes de ser visualizadas al microscopio.

Para evaluarlas se colocó en un portaobjetos una gota de “antifading” DABCO (0.22 M en solución de Glicerol:PBS [9:1 v/v]), utilizado para conservar la fluorescencia y sobre ella se depositaron 6 μL de la muestra teñida. Finalmente, se colocó un cubreobjetos que se selló con esmalte sintético para evitar la desecación y las preparaciones se conservaron a -20 $^{\circ}\text{C}$ protegidas de la luz hasta ser analizadas.

Las preparaciones fueron visualizadas mediante un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E-400. Se utilizó un filtro V-2A de 420- 490 nm de excitación y 510 nm de emisión. Se evaluaron a 1000x aumentos totales utilizando un objetivo de inmersión, y se evaluaron un mínimo de 150 espermatozoides de cada una de las preparaciones, diferenciando entre capacitados, no capacitados y los que han sufrido la reacción acrosómica (Figura 5.4).

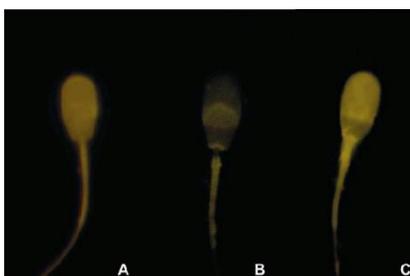


Figura 5.4. Patrones de tinción con CTC en espermatozoides. El patrón A muestra una tinción fluorescente uniforme indicativo que el espermatozoide no está capacitado (NC); el patrón B únicamente muestra fluorescencia en la región ecuatorial, indicativo de reacción acrosómica (R); el patrón C muestra fluorescencia en la mitad acrosomal de la cabeza, indicativo de capacitación (C) Imagen tomada de (43).

5.7 Análisis de quimiotaxis

5.7.1 Preparación de muestras y carga en la cámara de quimiotaxis

Las cámaras usadas para el estudio de la quimiotaxis fueron las **IBIDI® μ -Slide Chemotaxis**, que presentan 3 módulos independientes. En cada cámara de las utilizadas este trabajo, en dos de los módulos se ensayó el fluido folicular a dos concentraciones distintas, y el tercero se dejó como control, sin añadir el agente quimiotáctico. Cada módulo está constituido por 2 reservorios, unidos entre sí mediante un “puente” (segmento \overline{AB} en la figura 5.5). Las cámaras se atemperaron previamente a 37 °C. En el puente central (AB) y en los reservorios (CD y EF) se inyectaron 6 μ L y 65 μ L respectivamente de la muestra a estudiar: espermatozoides *swim-up* o capacitados C o K, a una concentración de 5×10^6 cél/mL, en medio mHTF-A. Se utilizó medio con BSA (mHTF-A) ya que previene la agregación celular. En este caso, si los espermatozoides se agregasen, no podrían moverse libremente, por lo que las trayectorias quimiotácticas no serían las reales, pudiendo alterar drásticamente los resultados de los ensayos.

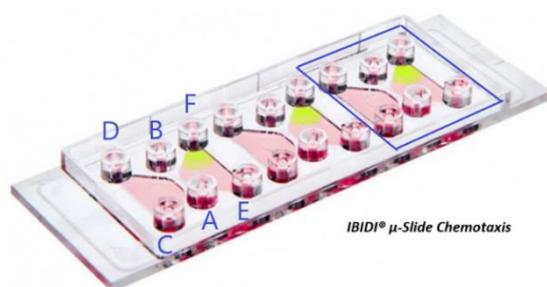


Figura 5.5. Cámara IBIDI® μ -Slide Chemotaxis, en la que se han identificado los distintos orificios (A, B, C, D, E, F) por los que se introducen las soluciones o medios para el ensayo, y se ha remarcado en azul uno de los tres módulos de análisis quimiotácticos independientes de la cámara. Se ha simulado en color verde el gradiente químico que se establecería al inyectar desde F, la potencial sustancia quimiotáctica, en este caso fluido folicular.

Se ensayaron los dos fluidos foliculares (FF) a dos concentraciones distintas: 2% y 10% (v/v). Al reservorio que contenía 65 μ L de medio mHTF-A junto con los espermatozoides, se le añadió (a través del orificio F) 30 μ L de una dilución que contenía fluido folicular del tipo y la concentración estudiada en cada caso, junto con los espermatozoides y el medio. La disposición experimental se plasma en la figura 5.6.



Figura 5.6. Esquema resumen de disposición de las 3 preparaciones utilizadas. Cada una de las cámaras contendrá un tipo de muestra distinto. En los módulos “control” no habrá fluido folicular (FF), que es el agente quimiotáctico. En los módulos 2% FF y 10% FF se inyectará el fluido folicular a dichas concentraciones. El color verde simula los gradientes químicos de fluido folicular.

Dado que la concentración del fluido folicular se vería diluida a la mitad, esta se preparó al doble de la concentración deseada. En el módulo que se dejó como control, se añadió el mismo volumen de mHTF-A con los espermatozoides.

Los desplazamientos de los espermatozoides se grabaron en el puente central gracias a una cámara de vídeo (acA1920-155uc, Basler, Exton, PA, EE. UU.) acoplada a un microscopio de

contraste de fases (Nikon eclipse 50i, Nikon, Tokyo, Japón). Se grabaron vídeos de 3 segundos, en tres campos diferentes para cada muestra experimental (control, con 2% de FF (fluido folicular) o con 10% de FF) en espermatozoides *swim-up*, C y K. Los vídeos se tomaron a una resolución de 800x600 ppp y a 200 fotogramas/ segundo. La velocidad de bits total fue de 887040 kbps.

Se realizaron 4 experimentos para cada uno de los dos fluidos foliculares. Para cada condición de ensayo (control/ 2%/ 10%) se tomaron 3 vídeos a modo de réplicas para luego analizar la posible quimiotaxis.

5.7.2 Análisis de quimiotaxis medianteel Software OpenCasa – Índice quimiotáctico (Ch_{Index})

Los vídeos obtenidos se analizaron usando el módulo de quimiotaxis del software libre *OpenCASA*, desarrollado por el grupo de investigación en el que se ha realizado el presente trabajo (40). Este módulo detecta las trayectorias de espermatozoides individuales y las normaliza a un mismo punto de referencia (origen) (Figura 5.7), para poder comparar trayectorias. Seleccionaremos una sección de los 360° totales, denominada “cono quimiotáctico”, que es la sección con posible influencia del gradiente químico, en este caso, el fluido folicular.

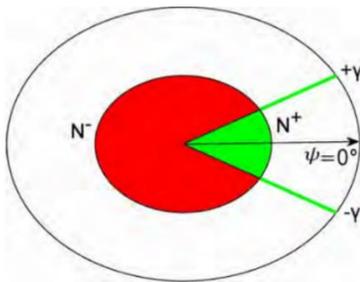


Figura 5.7. Representación angular del análisis quimiotáctico proporcionada por el software OpenCASA (40). Los espermatozoides con trayectorias de ángulos instantáneos dentro de la sección verde (cono quimiotáctico), serán considerados quimioatraídos y pertenecientes a la población N⁺. Lo contrario pasará con los ángulos correspondientes a la sección roja. La expresión para el cálculo del Ch_{Index} que utiliza el software es la siguiente:

$$Ch_{Index} = \frac{N^+}{N^+ + N^-} \times 100$$

En este caso concreto, se consideraron como quimioatraídos aquellos espermatozoides con mayoría de ángulos de desplazamiento apuntando hacia la derecha (0° en la figura 5.7), ya que es por ese lado por el que ejercerá su posible influencia el fluido folicular, colocado en el reservorio de la derecha. Sin embargo, debido al sistema de lentes, que invierte la imagen, en el software se seleccionó el valor de 180°. Una vez que el programa analizó todas las trayectorias de cada video, proporcionó el **índice quimiotáctico (Ch_{Index})**, es decir, el número de ángulos de desplazamiento apuntando hacia la dirección del gradiente químico, respecto al número total de ángulos de desplazamiento que se han registrado (40). Este valor fue tratado en tanto por uno, por lo que podrá tomar valores de 0 a 1, siendo el valor 1 asignado a un desplazamiento neto por parte de todas las células analizadas hacia la sustancia quimiotáctica.

5.8 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de los resultados se llevaron a cabo utilizando el software *GraphPad PRISM*® (versión 5.1; USA).

Para examinar la existencia de posibles diferencias significativas ($p \leq 0,05$, $p < 0,01$ o $p < 0,001$) en los resultados de motilidad, viabilidad, CTC e índices quimiotácticos, se llevó a cabo un estudio con distribución *Chi cuadrado* (χ^2). Los resultados se muestran como la media \pm error estándar de la media (mean \pm SEM).

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Análisis del estado de las muestras espermáticas

Antes de realizar los ensayos de quimiotaxis, fue necesario evaluar el estado de las muestras, en cuanto a porcentajes de motilidad y viabilidad. Además, una vez llevada a cabo la inducción de la capacitación *in vitro*, había que comprobar la eficacia del proceso y analizar las diferencias en porcentaje de espermatozoides capacitados entre las distintas muestras (*swim-up*, capacitadas control y capacitadas *cocktail*).

6.1.1 Motilidad

Los valores medios de motilidad total y progresiva en las muestras seleccionadas por *swim-up* fueron de $79,25 \pm 5,51\%$ y $37,13 \pm 3,90\%$, respectivamente. Ambos valores disminuyeron significativamente ($p < 0,001$) hasta un 60-70% de motilidad total y un 20-25% de motilidad progresiva cuando las muestras se sometieron al proceso de capacitación *in vitro*, como queda reflejado en la figura 6.1.

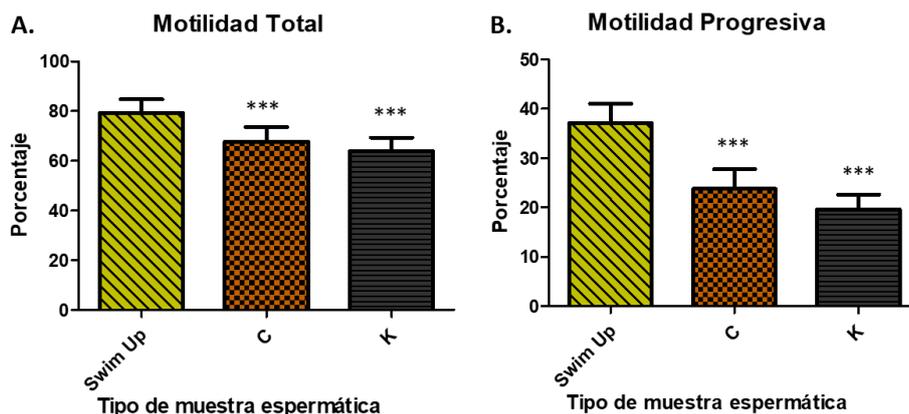


Figura 6.1. Motilidad total (A) y progresiva (B) de muestras sin capacitar (*swim-up*) y sometidas a capacitación *in vitro* sin (control, C), y con *cocktail* de sustancias capacitantes (K). Los resultados se expresan en %, como media \pm SEM (n=8). ***: indica $p < 0,001$ respecto al *swim-up*.

Los resultados coincidieron con lo esperado (45), ya que tras la capacitación espermática, los espermatozoides pasaron de llevar mayoritariamente una trayectoria rectilínea (motilidad progresiva), a una curvilínea, disminuyendo muy significativamente ($p < 0,001$) los valores medios de motilidad progresiva en las dos muestras capacitadas frente a la no capacitada (*swim-up*). Lo mismo ocurrió con la motilidad total, que disminuyó significativamente ($p < 0,001$) en las muestras capacitadas frente a *swim-up*. Esto último podría ser debido a que el proceso de capacitación *in vitro* dura unas dos horas, y durante ese tiempo de incubación, a temperatura ligeramente más alta que la fisiológica en el testículo, la motilidad disminuye, porque los espermatozoides van agotando sus reservas energéticas (44). Los resultados no evidenciaron variaciones significativas en motilidad entre espermatozoides capacitados control y *cocktail*.

6.1.2 Viabilidad (integridad de membrana)

En cuanto a la viabilidad o integridad de membrana, también disminuyó tras la capacitación *in vitro*. El porcentaje de espermatozoides viables en muestras sin capacitar (*swim-up*: $82,9 \pm 2,07\%$), se redujo significativamente ($p < 0,001$) hasta $75,98 \pm 2,56\%$ y $75,00 \pm 2,50\%$ en muestras capacitadas control y *cocktail*, respectivamente. Sin embargo, tampoco se observaron diferencias significativas en la viabilidad entre ambos tipos de muestras capacitadas (C y K) (Fig 6.2).

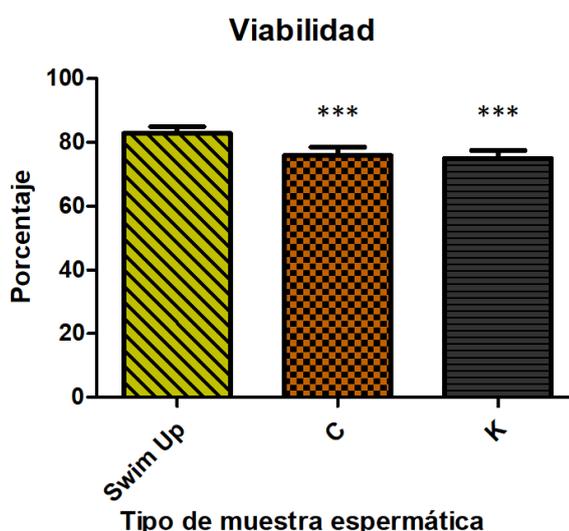


Figura 6.2. Viabilidad (integridad de membrana) de muestras sin capacitar (*swim-up*) y sometidas a capacitación *in vitro* sin (control, C), y con *cocktail* de sustancias capacitantes (K). Los resultados se expresan en %, como media \pm SEM ($n=8$). ***: indica $p < 0,001$ respecto al *swim-up*.

A pesar de este ligero descenso producido por la incubación en condiciones capacitantes, la viabilidad de las muestras fue muy alta, y, por tanto, se consideraron perfectamente aptas para los estudios de quimiotaxis (27).

6.1.3 Estado de capacitación

Los resultados de la evaluación de las muestras tras la tinción con CTC, mostraron diferencias significativas ($p < 0,001$) en el porcentaje de espermatozoides capacitados entre los tres tipos de tres muestras, pasando de una media de 3,75% en muestras sin capacitar, a 10,88% y 22,50% en muestras capacitadas control y *cocktail*, respectivamente. También se observaron diferencias significativas entre ambas muestras capacitadas, siendo mayor el porcentaje de espermatozoides capacitados en las muestras *cocktail*. Este aumento en el porcentaje de espermatozoides capacitados fue concomitante con un descenso en el porcentaje de los no capacitados.

En cuanto a los espermatozoides “reaccionados”, existen diferencias significativas entre los tres tipos de muestras, aumentando su porcentaje tras la capacitación, especialmente en muestras *cocktail* (K).

Con todo ello, no se han obtenido unos niveles de capacitación tan altos como los esperados en base a trabajos anteriores, en los que, normalmente se suele superar el 40% de espermatozoides capacitados (27). Esto podría deberse a que en este estudio la incubación en

condiciones capacitantes se ha llevado a cabo durante 2 horas por motivos de horarios académicos, en vez de en las 3 horas idóneas.

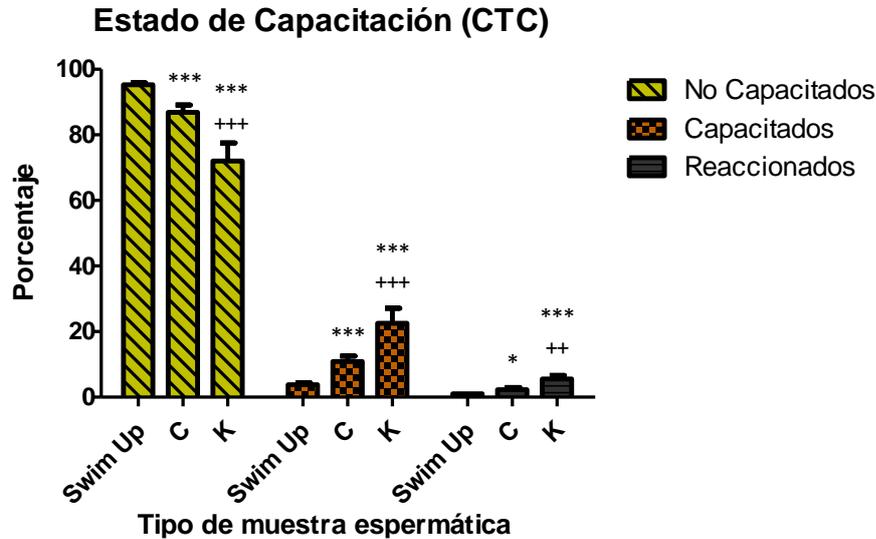


Figura 6.3. Estado de capacitación (CTC) de muestras sin capacitar (*swim-up*) y sometidas a capacitación *in vitro* sin (control, C), y con *cocktail* de sustancias capacitantes (K). Los resultados se expresan en %, como media \pm SEM (n=8). *, ***: indica $p \leq 0,05$, $p < 0,001$ respectivamente respecto a *swim-up*. ++, +++: indica $p < 0,01$, $p < 0,001$ respectivamente respecto a capacitados control (C).

6.2 Estudio del posible efecto quimioatractivo del fluido folicular sobre los espermatozoides ovinos

Ninguno de los fluidos foliculares ensayados provocó una quimioatracción en los espermatozoides seleccionados por *swim-up* a ninguna de las concentraciones evaluadas (Figura 6.4). Esto coincide con resultados de otras especies, que demostraron que sólo los espermatozoides capacitados muestran una respuesta hacia los quimioatrayentes (19).

El fluido de fase folicular temprana (FFT) ejerció un efecto quimioatractivo tanto en espermatozoides capacitados control (C) como en capacitados *cocktail* (K) (figura 6.4). En las muestras capacitadas control, sólo la concentración de 10% FF provocó un efecto quimioatractivo, con diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al medio sin fluido folicular (0% FF), o con un 2% FF. Sin embargo, en las muestras *cocktail*, se observó efecto con ambas concentraciones de FF (2 y 10%), con diferencias significativas ($p < 0,01$ y $p \leq 0,05$, respectivamente) en comparación con el medio sin fluido folicular.

Además, al comparar la respuesta de las distintas muestras espermáticas sometidas a la misma concentración de FF, se observó que únicamente los espermatozoides C en presencia de una concentración del 10% FF obtenido en fase folicular temprana mostraron una respuesta quimiotáctica significativamente mayor ($p < 0,001$) que los espermatozoides *swim-up* en la misma situación experimental.

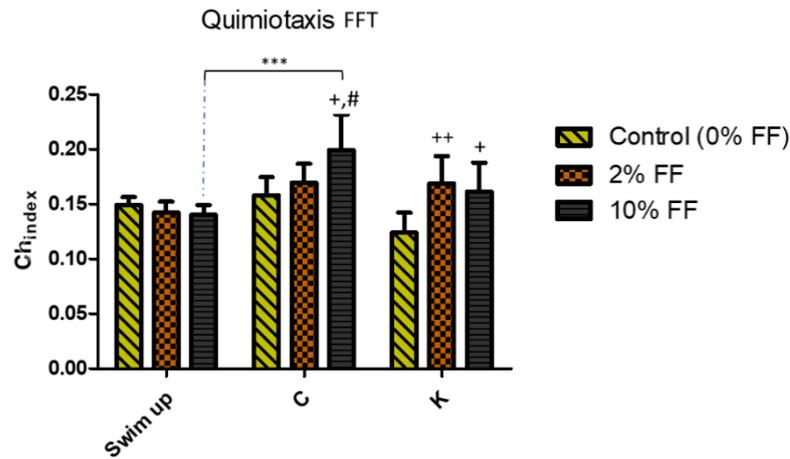


Figura 6.4. Respuesta quimiotáctica de espermatozoides sin capacitar (*swim-up*) y sometidas a capacitación in vitro sin (control, C), y con un *cocktail* de sustancias capacitantes (K) en presencia de distintas concentraciones de fluido folicular obtenido en fase folicular temprana (FFT) (0%, 2% y 10% FF). Los resultados se expresan en %, como media \pm SEM (n=8). +, ++: indica $p \leq 0,05$, $p < 0,01$, respectivamente respecto a control (0% FF); #: indica $p \leq 0,05$ respecto a 2% FF para cada muestra espermática (*swim-up*, C y K). *** indica diferencias significativas $p < 0,001$ entre muestras espermáticas sometidas a la misma concentración de fluido folicular (FF).

Por su parte, el fluido folicular obtenido en fase luteal temprana (FLT) (Figura 6.5), ejerció un efecto quimioatrayente para espermatozoides ovinos capacitados (C y K), pero únicamente cuando se utilizó a una concentración del 10% (figura 6.5) presentó diferencias significativas tanto con el medio 0% FF ($p < 0,001$), como cuando se añade fluido folicular a baja concentración ($p < 0,01$ en espermatozoides C y $p < 0,001$ en espermatozoides K, respectivamente).

En el caso del FLT, al comparar espermatozoides *swim-up*, C y K sometidos a la misma concentración de FF, se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$) tanto entre *swim-up* y C, como entre *swim-up* y K a las dos concentraciones ensayadas (2% y 10%).

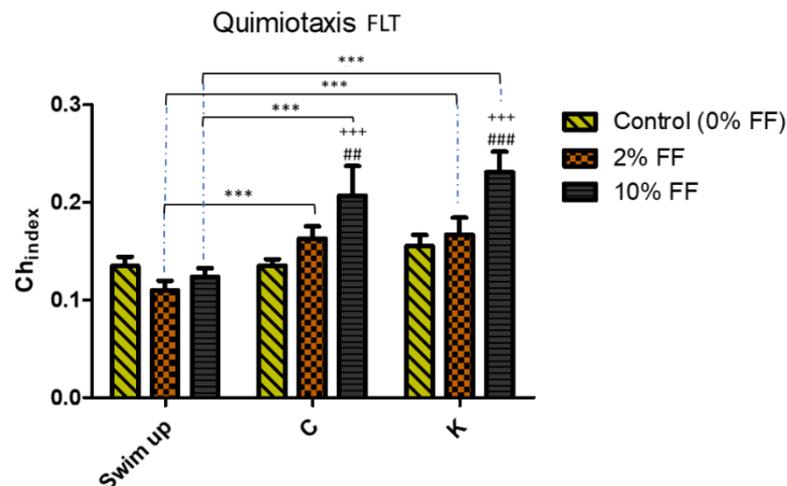


Figura 6.5. Respuesta quimiotáctica de espermatozoides sin capacitar (*swim-up*) y sometidas a capacitación in vitro sin (control, C), y con un *cocktail* de sustancias capacitantes (K) en presencia de distintas concentraciones de fluido folicular obtenido en fase luteal temprana (FLT) (0%, 2% y 10% FF). Los resultados se expresan en %, como media \pm SEM (n=8). +++: indica $p < 0,001$ respecto a control (0% FF); ##, ###: indica $p < 0,01$, $p < 0,001$ respectivamente respecto a 2% FF para cada muestra espermática (*swim-up*, C y K). *** indica diferencias significativas $p < 0,001$ entre muestras espermáticas sometidas a la misma concentración de fluido folicular (FF).

Este trabajo demuestra que los espermatozoides ovinos son quimioatraídos hacia fluidos foliculares obtenidos en fase folicular temprana (FFT) y fase luteal temprana (FLT). Esta respuesta no había sido descrita en la especie ovina hasta la fecha, aunque sí que se había demostrado en el caso de espermatozoides humanos y de ratón (24,25). El fluido folicular ejerce una atracción quimiotáctica sobre los espermatozoides, posiblemente debida a los estrógenos, progesterona (19) u otros compuestos desconocidos (o mezclas de ellos) con capacidad quimiotáctica del fluido folicular, que estarían también presentes en el fluido del folículo ovulatorio, y que, presuntamente, guiarían a los espermatozoides hasta el ovocito tras darse la monta durante el estro, que es la fase inmediatamente anterior al metaestro.

Las muestras *swim-up*, que mostraban un bajo porcentaje de espermatozoides capacitados evaluados mediante la tinción de CTC (apdo. 6.1.3), no mostraron ninguna quimioatracción ante ninguno de los dos fluidos foliculares analizados, a diferencia de las muestras C y K, con mayor porcentaje de espermatozoides capacitados. Esto nos permite confirmar que **únicamente los espermatozoides ovinos capacitados son capaces de responder quimiotácticamente** ante una sustancia o compuesto quimioatrayente, como se ha demostrado en otras especies (19).

Sin embargo, los resultados no mostraron una diferente respuesta quimiotáctica entre espermatozoides C y K sometidos a la misma concentración de fluido folicular. Esto podría deberse a que, pese a haber en la muestra K un número significativamente mayor ($p < 0,001$) de espermatozoides capacitados que en C (Figura 6.3), la diferencia no era suficiente como para traducirse en unas diferencias significativas en cuanto a su respuesta quimiotáctica.

En general, ambos grupos de espermatozoides capacitados (C y K) responden significativamente mejor ($p \leq 0,05$) a una concentración de 10% (v/v) de ambos fluidos foliculares, comparándolo con la respuesta obtenida en presencia de un 2% (v/v) de los mismos (figura 6.4 y 6.5), lo que sugeriría que esta respuesta quimiotáctica frente al fluido folicular sería dependiente de la concentración (46). Los resultados obtenidos sugieren **que ambas concentraciones de fluido folicular afectan por igual a espermatozoides sin (C) o con (K) agentes inductores de la capacitación.**

7 CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, las conclusiones que pueden extraerse son las siguientes:

1. El proceso de capacitación produce cambios significativos en los espermatozoides ovinos a nivel de motilidad, viabilidad, y capacidad de respuesta ante agentes quimioatrayentes.
2. Los espermatozoides ovinos de muestras sometidas a capacitación *in vitro*, son capaces de moverse en la dirección del gradiente creado por el fluido folicular obtenido en distintos momentos del ciclo estral de la oveja.
3. Se observa quimiotaxis espermática para ambos fluidos foliculares ensayados (procedentes de fases de proestro y metaestro), tanto a 2% como a 10% (v/v), si bien la respuesta es más acusada a 10%.
4. No hay diferencias significativas entre la respuesta quimiotáctica observada en la muestra capacitadas sin (control) y con agentes elevadores del AMPc (*cocktail*).

8 CONCLUSIONS

The conclusions of this study, according to the results obtained are:

1. Capacitation significantly changes ovine spermatozoa, in terms of motility, viability and chemotactic response.
2. *In vitro* capacitated ram spermatozoa are able to move towards follicular fluid gradients obtained from different stages of the sheep oestrus cycle.
3. Chemotaxis is observed in both follicular fluids tested (obtained in proestrus and metaestrus stages), at both concentrations (2 and 10% (v/v)), even though a stronger response is observed with 10% (v/v) concentration.
4. There are not significant differences between capacitated samples without (control) and with (*cocktail*) cAMP elevating-agents in terms of chemotactic response.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Bedford JM. Significance of the Need for Sperm Capacitation Before Fertilization in Eutherian Mammals. *Biol Reprod.* 1983;28(1):108–20.
2. El-Shahat KH, Taysser MI, Badr MR, Zaki KA. Effect of oviduct and follicular fluids on ram sperm capacitation and acrosome reaction in vitro. *Int J Vet Sci Med [Internet].* 2018;6(sup1):S57–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.12.002>
3. Olivera Ángel M, Ruíz T, Tarazona Morales A, Giraldo Echeverri C. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Colomb Ciencias Pecu.* 2006;19(4):426–36.
4. Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C, Forti G. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Front Biosci.* 1996;1(September).
5. Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol.* 2002;53(1–2):133–50.
6. Boatman DE, Robbins RS. Bicarbonate: Carbon-Dioxide Regulation of Sperm Capacitation, Hyperactivated Motility, and Acrosome Reactions1. *Biol Reprod.* 1991;44(5):806–13.
7. Visconti PE, Muschietti JP, Flawia MM, Tezon JG. Bicarbonate dependence of cAMP accumulation induced by phorbol esters in hamster spermatozoa. *BBA - Mol Cell Res.* 1990;1054(2):231–6.
8. Naresh S, Atreja SK. The protein tyrosine phosphorylation during in vitro capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Cryobiology [Internet].* 2015;70(3):211–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.03.008>
9. Chang H, Suarez SS. Rethinking the Relationship Between Hyperactivation and Chemotaxis in Mammalian Sperm1. *Biol Reprod.* 2010;83(4):507–13.
10. Suarez SS, Ho HC. Hyperactivation of mammalian sperm. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2003;49(3):351–6.
11. Arenas E, Cambron A, Ambriz D, Zuñiga P, Rodriguez A, Rosado A. Bases fisiológicas de la capacitacion y de la reaccion acrosomal del espermatozoide. *Contactos [Internet].* 2010;78:5–11. Available from: <http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n78ne/fisiologica.pdf>
12. Leroy JLMR, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PEJ, et al. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 2004;80(3–4):201–11.
13. Dieleman SJ, Kruij TAM, Fontijne P, Jong WHR De, Weyden GC Van Der. *Changes Collection of follicles.* 1982;
14. Ganguly A, Ganguly I, Meur SK. Multiple molecular forms of inhibin in buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian follicular fluid. *Res Vet Sci [Internet].* 2010;89(1):14–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.01.014>
15. Brzezinski A, Seibel MM, Lynch HJ, Deng MH, Wurtman RJ. Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;64(4):865–7.
16. Pacheco, J.I.1 y Coila P. Composition of the follicular fluid of alpaca (*vicugna pacos*) in different states of development. *Arch Zootec.* 2010;vol.59 no.
17. Kaupp UB, Kashikar ND, Weyand I. Mechanisms of Sperm Chemotaxis. *Annu Rev Physiol.* 2008;70(1):93–117.
18. Eisenbach M. Sperm chemotaxis. *Rev Reprod.* 1999;4(1):56–66.
19. Gimeno, S., Alqueza-Baeta, C., Peinado, J., Nadal, P., Casao, A., Cebrián-Pérez, JA., Muiño-Blanco, T., y Pérez-Pé R. Influencia de la progesterona y etradiol en la orientación espermática ovina. XVII Jornadas sobre Prod Anim. 2017;395–7.
20. S. Gimeno-Martos, M. González-Arto, A. Casao, M. Gallego, J.A. Cebrián-Pérez TM-, Pérez-Pé* B and R. Steroid hormone receptors and direct effects of steroid hormones on ram spermatozoa. *Soc Reprod Fertil.* 2017;Manuscript.
21. Baldi E, Luconi M, Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Forti G. Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: Facts and fictions. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;308(1–2):39–46.
22. Teves ME, Guidobaldi HA, Uñates DR, Sanchez R, Miska W, Publicover SJ, et al. Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone. *PLoS One.* 2009;4(12).
23. Guidobaldi HA, Teves ME, Uñates DR, Anastasia A, Giojalas LC. Progesterone from the cumulus cells is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus complex. *PLoS One.* 2008;3(8):1–9.
24. Ralt D, Manor M, Cohen-Dayag A, Tur-Kaspa I, Ben-Shlomo I, Makler A, et al. Chemotaxis and Chemokinesis of Human Spermatozoa to Follicular Factors1. *Biol Reprod.* 1994;50(4):774–85.

25. R. G. Oliveira, L. Tomasi RAR and LCG. Increased velocity and induction of chemotactic response in mouse spermatozoa by follicular and oviductal fluids. *J Reprod Fertil.* 1998;115(March):23–7.
26. Cardinali SRP-P and DP. Melatonin: From Molecules to Therapy. Cardinali SRP-P and DP, editor. New York: Nova Medical Books, Inc; 2007. 467 p.
27. Gimeno-Martos S, Casao A, Yeste M, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T, Pérez-Pé R. Melatonin reduces cAMP-stimulated capacitation of ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev.* 2019;31(2):420–31.
28. Minguini IP, Luquetti CM, Baracat MCP, Maganhin CC, de Oliveira Nunes C, Simões RS, et al. Melatonin effects on ovarian follicular cells: A systematic review. *Rev Assoc Med Bras.* 2019;65(8):1122–7.
29. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, et al. Extrapineal melatonin: Sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(16):2997–3025.
30. Gimeno Martos S. Efecto de la melatonina sobre la capacitación espermática en la especie ovina. 2015;61.
31. Cebrian-Perez, J; Borao, S ; Perez-Pe, R; Muino-Blanco, T ; Casao A. Melatonin in sperm biology: Breaking paradigms. In: REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS. Joint Meeting of the 20th Annual Conference of the European-Society-for-Domestic-Animal-Reproduction (ESDAR) / 13th Conference of the Spanish-Association-for-Animal-Reproduction (AERA); 2016. p. 81–2.
32. Cebrian-Perez, J; Borao, S ; Perez-Pe, R; Muino-Blanco, T ; Casao A. Papel de la melatonina como agente antioxidante y antiapoptótico en espermatozoides humanos. In: REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS. Joint Meeting of the 20th Annual Conference of the European-Society-for-Domestic-Animal-Reproduction (ESDAR) / 13th Conference of the Spanish-Association-for-Animal-Reproduction (AERA); 2016. p. 81–2.
33. Peña C, Rincon J, Pedreanez A, Viera N, Mosquera J. Chemotactic effect of melatonin on leukocytes. *J Pineal Res.* 2007;43(3):263–9.
34. Cebrian-Perez, J ; Borao, S ; Perez-Pe, R; Muino-Blanco, T ; Casao A. Sperm chemoattractant and capacitation modulator role of melatonin during the non-breeding season. *Reprod Domest Anim.* 2016;51:81–2.
35. Chemotaxis Assays | μ -Slide, Boyden, Zigmond, Dunn | ibidi [Internet]. [cited 2020 Jun 23]. Available from: <https://ibidi.com/content/310-chemotaxis-assays>
36. Boyden BS, Ph D. THE CHEMOTACTIC EFFECT OF MIXTURES OF ANTIBODY AND ANTIGEN ON POLYMORPHONUCLEAR LEUCOCYTES. *Assessment.* 1962;453–66.
37. Zigmond SH. ABILITY OF POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES TO ORIENT IN GRADIENTS OF CHEMOTACTIC FACTORS. *J Cell Biol.* 1977;75:606–16.
38. Zicha D, Dunn GA, Brown AF. A new direct-viewing chemotaxis chamber. *J Cell Sci.* 1991;99(4):769–75.
39. Armon L, Caplan SR, Eisenbach M, Friedrich BM. Testing human sperm chemotaxis: How to detect biased motion in population assays. *PLoS One.* 2012;7(3):1–7.
40. Alquézar-Baeta C, Gimeno-Martos S, Miguel-Jiménez S, Santolaria P, Yániz J, Palacín I, et al. OpenCASA: A new open-source and scalable tool for sperm quality analysis. *PLoS Comput Biol.* 2019;15(1):1–18.
41. N. Garcia-Lopez, M. Ollero TM-B and JAC-P. A DEXTRAN SWIM-UP PROCEDURE FOR SEPARATION OF HIGHLY MOTILE AND VIABLE RAM SPERMATOZOA FROM SEMINAL PLASMA. *ELSEVIER.* 1996;26(4):551–6.
42. Alvarez JG, Lasso JL, Blasco L, Nuñez RC, Heyner S, Caballero PP, et al. 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. *Hum Reprod.* 1993;8(7):1087–92.
43. Teijeiro JM. Determinación del rol biológico de SBG (Sperm Binding Glycoprotein) aislada de oviducto porcino sobre espermatozoides homólogos. Dr Thesis. 2009;
44. Grasa P, Cebrián-Pérez JÁ, Muiño-Blanco T. Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation. *Reproduction.* 2006;132(5):721–32.
45. Luna C, Yeste M, Rivera Del Alamo MM, Domingo J, Casao A, Rodríguez-Gil JE, et al. Effect of seminal plasma proteins on the motile sperm subpopulations in ram ejaculates. *Reprod Fertil Dev.* 2017;29(2):394–405.
46. Fabro G, Rovasio RA, Civalero S, Frenkel A, Caplan SR, Eisenbach M, et al. Chemotaxis of Capacitated Rabbit Spermatozoa to Follicular Fluid Revealed by a Novel Directionality-Based Assay1. *Biol Reprod.* 2002;67(5):1565–71.

