



ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DE LA CAPACITACIÓN *IN VITRO*
DE ESPERMATOZOIDES DE CIERVO IBÉRICO
(Cervus elaphus hispanicus)

María Iniesta Cuerda



Tesis Doctoral

Dirigida por:

Ana Josefa Soler Valls

José Julián Garde López-Brea



UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN RECURSOS CINEGÉTICOS

Grupo de Sanidad y Biotecnología (SaBio)

DOCTORADO EN CIENCIAS AGRARIAS Y AMBIENTALES

**Estudio y optimización de la capacitación *in vitro* de
espermatozoides de ciervo Ibérico
(*Cervus elaphus hispanicus*)**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:

María Iniesta Cuerda

DIRECTORES:

Ana Josefa Soler Vals y José Julián Garde López Brea

La Dra. Ana Josefa Soler Valls, Profesora Titular del Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética de la Universidad de Castilla-La Mancha y el Dr. Julián Garde López-Brea Catedrático del Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética de la Universidad de Castilla-La Mancha.

INFORMAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada **“Estudio del efecto del suero de oveja en celo sobre la capacitación espermática y la producción *in vitro* de embriones en pequeños rumiantes: optimización de la técnica de fecundación *in vitro* en ciervo Ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*) a través del desarrollo de un medio de capacitación definido”**, realizada por D^a. María Iniesta Cuerda, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, reúne la calidad y el rigor científico necesario para su presentación y defensa en la Universidad de Castilla-La Mancha con el fin de obtener el grado de doctor. Asimismo, la presente Tesis Doctoral cumple los requisitos exigidos para optar a la Mención de Doctorado Internacional.

Para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente documento.

Albacete, 21 de octubre 2020

Fdo.: Dra. Ana Josefa Soler Valls

Fdo.: Dr. José Julián Garde López-Brea

Agradecimientos

Dicen que agradecer hace que tu corazón hable... Y creo que así es... Pues lo siguiente está escrito a golpe de latido.

Gracias a mis directores Julián y Pepi, faro y espejo en el que mirarme... Si todo tiene un principio y un final, con vosotros no sabría con qué empezar porque no podré nunca terminar de agradecer... Gracias por vuestras lecciones, que siempre serán para mí las mejores y más bonitas del mundo.

Gracias Julián por esas clases, por aquellos viajes, por hacerme sentir una más siempre, por tus consejos, por meterme el bicho dentro... ¡¡Tuya es la culpa!! Y gracias por tus “seguimos”, que tanto bueno nos ha traído y seguro va a traer, espero que a ti el primero...

También he oído que cuando bebas agua, recuerdes siempre la fuente... Mi caño ha sido **Pepi**, y por mucho que quisiera jamás podría olvidarte. Gracias por enseñarme todo, por tu confianza, por tu ayuda, por lo que hemos sido. Gracias por la oportunidad y por regalarme tantas cosas y momentos.

Gracias también a Rocío, por las risas y también los llantos. Te tengo mucho cariño. Gracias a los tres por todo y gracias por vuestra comprensión cuando los tiempos fueron difíciles. **Seré eternamente vuestra.**

Gracias a Olga... Por todo. Porque ese todo fuera, es, y vaya a continuar siendo tanto. Por mucho que me esfuerce, no encuentro maneras de agradecerte tu dedicación tal y como te lo mereces. GRACIAS, AMIGA, ERES DE ESAS PERSONAS QUE HACES LA DIFERENCIA. GRACIAS MIL VECES. Igualmente, **siempre tuya.**

A Alejandro, Enrique, Luis y Alfonso... Por aquellos principios, por ser tan divertidos. En especial a Alejandro y Enrique... A Alejandro, por esa confianza que siempre hemos tenido y compartir conmigo esa bondad única que atesoras. A Enrique, por su disposición constante. A ambos por enseñarme tantas cosas.

A las ya famosas “*sperm girls*”. Por todas y cada una de las cosas vividas, **gracias**. Gracias por enseñarme a trabajar en equipo. No imagino mejores ni más locas compañeras que vosotras. Gracias por vuestro trabajo obcecado que tanto me ha ayudado. A Ali gracias también por tu confianza, a Irene por tu apoyo constante y a ti Patri, porque contigo, una se ríe dos veces. Pero, sobre todo, gracias porque fuisteis refugio cuando la guerra estaba en casa. Todos mis recuerdos con vosotras los almaceno en el corazón, no en la memoria de la mente. Os quiero y querré siempre. De nuevo, **eternamente vuestra**.

Gracias también a Laura por tus ganas inagotables, a Carolina por tu cariño tierno y a Daniela por tu sonrisa imborrable. Estoy segura de que nos encontraremos de nuevo y volveremos a disfrutar de esto juntas. Gracias en especial a ti Carolina por tu preocupación y por tu sentido del humor terapéutico. También gracias a Pedro y a Alex, por el interés mostrado conmigo. Gracias.

Gracias a la Escuela de Ingenieros Agrónomos de Albacete, mi segunda casa. Irá conmigo en el corazón siempre.

A José Antonio Ortiz, por tu generosidad y por tanto como me has enseñado.

A todos los investigadores y personal que forma el IREC, porque de vosotros también he aprendido que el esfuerzo es una forma de vida.

A Andreina y Lucia. Gracias porque con vosotras aprendí muchísimo y los recuerdos de aquella época son preciosos. Os llevo en mi corazón.

A Fina, por tantas conversaciones... Por tu interés, favores y consejos. Y a Pedro (Carburos) por tu voluntad, siempre dispuesto a ayudar y, también... A ponerme los dientes largos con tus lances. Suerte y salud para los dos.

Gracias a Pablo Visconti y a María Salicioni. Gracias también al resto de miembros del laboratorio de Reproducción de la Universidad de Massachusetts, Maria Gracia, Felipe, David y Bidur. Gracias por la oportunidad, lo que me enseñasteis allí traspasa lo académico. Os estaré eternamente agradecida.

Thanks to Debbie Friedlander for your help and support during the time that I spent in Amherts. I will never forget how you took care of me. Thank you.

A mis Mach@s queridos: Almu, Bony, Barbie, Coti, Geles, Juanlu, Mery y Nus. Gracias a mis adorados agrícolas: Ángel, Cesar, Coti, David, Isa, Mariana, Loco y Pablo. Nuestro *#desdeelcoalealinfinito* se me queda corto. Gracias a mi gente de ciudad Real: Fátima, Leti, Lauri, Nuri, Pablo y Pedro. Gracias también a Javi y a ti Visi. Gracias por la familia que hemos formado. Siempre me habéis regalado los mejores consejos, comprensión y apoyo incondicional, pero durante estos años de doctorado, aún los he sentido más cálidos que nunca. Gracias por hacerme sentir tan privilegiada. Desde lo más profundo de mi corazón, gracias.

A mi amigo Pedro Ponce, por su colaboración en esta tesis y por sus ánimos. Igualmente, gracias al resto de todos mis amigos que siempre me habéis mostrado tanto cariño y apoyo.

A mi madre Amparo y a mi padre Jesús, en los que la humildad, bondad, generosidad y el sacrificio toman forma. Gracias por todo. También gracias al resto de mi familia. A todos ellos gracias por el cariño, apoyo, ayuda y comprensión que siempre me muestran, más intensamente manifestados si cabe, durante estos años de tesis. Gracias en especial a mis mayores, por su legado y entrañable recuerdo. Si el tributo más noble a los que ya se fueron es la gratitud, aquí mi homenaje a ellos: **G R A C I A S**.

And finally, thanks to Feyzi... Thanks for your infinite understanding, constant support and true love. You are an angel who come down from heaven. Thanks to choose me to share the life.

A mi madre y padre queridos

To you, Feyzi

Resumen _____	13
Summary _____	19
1. Introducción general _____	25
2. Objetivos _____	37
3. Diseño experimental _____	41
1. Diseño experimental Capítulo I _____	43
2. Diseño experimental Capítulo II _____	44
3. Diseño experimental Capítulo III _____	45
4. Diseño experimental Capítulo IV _____	46
 CAPITULO I: Efecto de la variabilidad individual del suero de oveja en celo cuando se utiliza como agente capacitante en un sistema de fecundación in vitro sobre los cambios funcionales y moleculares de los espermatozoides de ovino.	 48
Resumen _____	50
1. Introducción _____	52
2. Materiales y métodos _____	54
3. Resultados _____	66
4. Discusión _____	71

CAPITULO II: Caracterización de los cambios moleculares, estructurales y funcionales de los espermatozoides descongelados de ciervo Ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*) durante la capacitación *in vitro*. **76**

Resumen_____	78
1. Introducción_____	80
2. Materiales y métodos_____	82
3. Resultados_____	92
4. Discusión_____	104

CAPITULO III: Efecto de la concentración de BSA sobre la capacitación espermática de espermatozoides descongelados de ciervo Ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*). **110**

Resumen_____	112
1. Introducción_____	114
2. Materiales y métodos_____	116
3. Resultados_____	122
4. Discusión_____	127

CAPITULO IV: Evaluación de la concentración de calcio, bicarbonato y efecto del pH sobre la funcionalidad y capacitación espermática en espermatozoides descongelados de ciervo Ibérico (<i>Cervus elaphus hispanicus</i>).	132
Resumen_____	134
1. Introducción_____	136
2. Materiales y métodos_____	138
3. Resultados_____	148
4. Discusión_____	158
5. Discusión general_____	164
6. Conclusions_____	177
7. Bibliografía_____	182
8. Anexos_____	213
1. Anexo I. Medios_____	215
2. Anexo II. Abreviaturas_____	221

RESUMEN

Resumen

En los últimos años, la cría en cautividad de ciervos se ha convertido en un tipo de ganadería alternativa de gran importancia en Europa. Las diferentes biotecnologías reproductivas, como la producción *in vitro* de embriones (PIVE), representan una herramienta de gran utilidad para la expansión de este sector, así como el aumento de su competitividad y rentabilidad. Sin embargo, el escaso desarrollo de estas técnicas en ciervo no permite, por el momento, proporcionar a los ganaderos una infraestructura comercial de producción, venta y transferencia de embriones. Uno de los principales motivos que impide el desarrollo de la PIVE en esta especie es la falta de conocimiento sobre la fisiología de sus espermatozoides. En este contexto, la información disponible acerca de la fase de capacitación espermática, mediante la cual los espermatozoides adquieren la capacidad de fecundar los ovocitos, es contradictoria, debido sustancialmente a los pocos trabajos que hay realizados en ciervo. Por este motivo, es común el uso de sustancias no definidas como el suero de oveja en celo (ESS) como agente capacitante en las rutinas de fecundación *in vitro* (FIV) dificultando su estandarización y un uso más amplio de esta tecnología.

Los trabajos llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral tienen como objetivo mejorar los protocolos de capacitación espermática implementados en la PIVE de ciervo mediante el estudio de la fisiología del espermatozoide durante esta fase, así como el desarrollo de un medio de capacitación definido para producir *in vitro* embriones de esta especie.

En primer lugar, en el Capítulo I evaluamos y comparamos el efecto del ESS obtenido de diferentes hembras sobre la funcionalidad espermática, así como sobre los resultados de capacitación y embriones producidos *in vitro* utilizando como modelo la especie ovina. Nuestros resultados mostraron que distintos ESSs tuvieron un efecto variable sobre el desarrollo de la fosforilación en los residuos de tirosina asociada al proceso de capacitación, evidenciando la necesidad de eliminar el ESS de los medios de capacitación *in vitro*. Sin embargo, no

observamos ningún efecto de los diferentes ESSs empleados sobre las tasas de embriones producidos ni sobre la actividad transcripcional de los mismos.

En el Capítulo II, caracterizamos por primera vez los cambios que los espermatozoides descongelados de ciervo experimentan durante la incubación en condiciones de capacitación *in vitro*. Para ello, monitorizamos durante diferentes tiempos de incubación (hasta 24 h) diversos parámetros de funcionalidad espermática, marcadores de capacitación y estado de la cromatina. Así, observamos que los espermatozoides de ciervo mostraron parámetros relacionados con la capacitación y un incremento progresivo de la descondensación de la cromatina (% HDS) tras un corto periodo de incubación ($t < 30$ min). Además, observamos que períodos de tiempo superiores a los 30 min provocaron una disminución de la funcionalidad de los espermatozoides. En la misma línea, los resultados de FIV corroboraron que las tasas de división de ovocitos fueron superiores durante los 30 primeros min de incubación en condiciones de capacitación, reduciéndose a partir de los 60 min. Finalmente, observamos una correlación positiva entre la fosforilación en los residuos de tirosina, la proporción de espermatozoides que muestran la fosforilación sólo en la región ecuatorial y acrosomal y el %HDS con la tasa de división a las 48 h.p.i., respectivamente, confirmando la importancia de estos parámetros durante la capacitación para incrementar la capacidad fecundante de los espermatozoides de ciervo.

En el Capítulo III evaluamos el efecto de diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina (BSA) como posible alternativa al uso de ESS en el medio de capacitación de los espermatozoides descongelados de ciervo. Nuestros resultados mostraron que, aunque no existieron diferencias en parámetros relacionados con la capacitación, como la fosforilación en tirosina, para las diferentes concentraciones de BSA evaluadas en relación a los medios control, el uso de BSA resultó adecuado para neutralizar las ROS y reducir el daño acrosomal. Sin

embargo, concentraciones de BSA a partir de 3 mg mL⁻¹ disminuyeron la viabilidad y la actividad mitocondrial de los espermatozoides de ciervo durante la capacitación.

Por último, en el Capítulo IV evaluamos el efecto de distintas concentraciones de Ca²⁺ y bicarbonato, así como de diferentes pH sobre la funcionalidad y capacitación espermática con el objetivo de mejorar el medio de capacitación sin ESS definido en el Capítulo anterior. Con esta serie de experimentos observamos que un fluido oviductal sintético formulado con 3 mg mL⁻¹ de BSA, 3 mM de Ca²⁺, 30 mM de NaHCO₃ y con un pH 7 desencadenó cambios compatibles con la capacitación espermática por encima de los observados en los espermatozoides incubados con ESS. No obstante, este medio para la capacitación *in vitro* (CIV) de espermatozoides de ciervo requiere de mejoras pues su uso durante la técnica de FIV no permitió alcanzar las mismas tasas de fecundación que las obtenidas con el ESS. Estos resultados podrían indicar que los ovocitos de esta especie también necesitan la influencia de determinadas concentraciones de Ca²⁺ y bicarbonato en el medio, que deberán estudiarse en futuros estudios, para su adecuada fecundación.

SUMMARY

Summary

Nowadays, captive breeding of deer has become a very important livestock alternative in Europe. The different reproductive biotechnologies, such as *in vitro* embryo production, represent a very useful tool for the growth of this sector and for increasing its competitiveness and profitability. However, at the moment, the development of these techniques in deer is still insufficient, which does not allow to provide farmers with a commercial infrastructure for the production, trade and embryo transfer. One of the main reasons that blocks the development of *in vitro* embryo production in this species is the lack of knowledge about sperm physiology. In this context, the information about sperm capacitation, through sperm acquire the ability to fertilize oocytes, is contradictory, due to the few studies that have been carried out in deer. For this reason, the use of undefined substances such as estrous sheep serum as a capacitation agent in IVF routines is common, making it difficult to standardize and use this technology more widely.

The aim of this Doctoral Thesis was to improve the protocols of sperm capacitation currently implemented in deer *in vitro* embryo production through the study of the sperm physiology during this phase, as well as the development of a defined capacitating medium to produce *in vitro* embryos of this species.

Firstly, in Chapter I it was evaluated and compared the effect of the serum extracted from different females in estrous on sperm functionality, as well as on capacitation, as well as embryo production and quality using the ovine species as a model. Our results showed that different estrous sheep serum had a variable effect on the development of tyrosine phosphorylation associated with the capacitation process, highlighting the need to eliminate estrous sheep serum from the capacitating media. However, we did not observe any effect of the different ESSs used on blastocyst production nor on their transcriptional activity.

In Chapter II, it was characterized, for the first time, the changes that thawed deer sperm undergo during capacitation. To do this, we monitored several parameters of sperm functionality, capacitation markers and chromatin status during different incubation times (up to 24 h). Thus, we observed that deer sperm showed capacitation-associated changes and a progressive increase in chromatin decondensation (% HDS) after a short incubation period ($<30\text{min}$). Furthermore, we observed that periods of incubation longer than 30 min caused a decrease in sperm functionality. In this line, the results of the *in vitro* fertilization test corroborated that the cleavage rates were higher during the first 30 min of incubation under capacitating conditions, which decreased after 60 min. Finally, we observed a positive correlation between tyrosine phosphorylation, the proportion of spermatozoa showing phosphorylation only in the equatorial and acrosomal region, and % HDS with the cleavage rate, respectively, confirming the importance of these parameters during sperm capacitation and the fertilizing capacity of deer sperm.

In the Chapter III it was evaluated the effect of different concentrations of bovine serum albumin (BSA) as a possible alternative of estrous sheep serum in the capacitating medium of thawed deer sperm. Our results showed that, although there were no differences in parameters related to capacitation, such as tyrosine phosphorylation, between the different concentrations of BSA evaluated and the control media, the use of BSA was adequate to neutralize ROS and reduce acrosomal damage. However, exceeding the concentration of 3 mg mL^{-1} decreased the viability and mitochondrial activity of deer sperm.

Finally, in the Chapter IV it was evaluated the effect of different concentrations of Ca^{2+} and bicarbonate, as well as of different pH on sperm functionality and capacitation, with the aim of improving the capacitating medium without estrous sheep serum defined in the previous Chapter. With this series of experiments we observed that a synthetic oviductal fluid formulated with 3 mg mL^{-1} of BSA, 3 mM of Ca^{2+} , 30 mM of NaHCO_3 and a pH 7 triggered capacitation-

associated changes above those observed in sperm incubated with ESS. However, this capacitating medium requires improvements since its use during the IVF technique did not reached similar fertilization rates than those obtained with the ESS.

INTRODUCCIÓN GENERAL

En los últimos 50 años se ha producido a nivel mundial una enorme expansión en el aprovechamiento industrial de las diferentes especies de cérvidos, la cual ha ido acompañada de un rápido desarrollo de biotecnologías reproductivas [1,2]. Así, la aplicación de TRA como la electroeyaculación, congelación y sexado de muestras espermáticas, inseminación artificial o la transferencia de embriones obtenidos *in vivo* o producidos *in vitro* han permitido difundir la genética de aquellos animales más productivos, contribuyendo también a la conservación de especies y subespecies de cérvidos en peligro de extinción [1,3–5]. En términos generales, la aplicación de las TRA en especies de cérvidos todavía presenta una serie de retos: (1) el conocimiento preciso de la biología reproductiva de la especie [6]; (2) la necesidad de información detallada de la fisiología de los gametos [7]; (3) así como la capacidad de manejar a los animales sin estrés o lesiones indebidas [6,8]. Como consecuencia, algunas TRA como la PIVE no han experimentado el desarrollo que se ha conseguido en otras especies de rumiantes más estudiadas (para revisiones consultar: bovino:[9]; ovino:[10]; caprino: [11]). De hecho, hoy en día la PIVE en ciervo continúa realizándose con protocolos extrapolados de estas especie sin apenas haber sido adaptados al ciervo, lo que posiblemente sea el origen del bajo rendimiento que se obtiene tras su aplicación. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo estudios en esta línea para lograr optimizar y establecer las diferentes TRA como herramientas eficientes para las explotaciones dedicadas a esta especie.

Nueva Zelanda es el país pionero en la utilización de TRA en ciervo rojo (*Cervus elaphus*) ya que concentra el mayor número de granjas de ciervo de todo el mundo [12,13]. Sin embargo, la expansión de este tipo de actividad más allá de Nueva Zelanda, Australia, China o Canadá, donde estos sistemas ya eran comunes [12], ha provocado que criadores de ciervos de todas las partes del mundo demanden asesoramiento y la aplicación de TRA que les permita aumentar la producción y rentabilidad de sus explotaciones de manera sostenible. En España, la producción de ciervo en cautividad ha experimentado el mismo crecimiento observado a nivel mundial,

quintuplicando en 2017 (últimas estadísticas disponibles) la producción de ciervos respecto del año 2015 [14].

El aprovechamiento industrial del ciervo está principalmente orientado a la producción de carne [13] y cuerna osificada o en crecimiento (vélvet) para la medicina natural asiática [15]. Además, la cría de ciervos como reproductores o para repoblaciones del medio natural, son otros de los aprovechamientos de los animales producidos en las granjas de ciervos [16]. Concretamente, las repoblaciones cinegéticas, que son habituales en la gestión de cotos de caza en España, son el destino de las producciones de las granjas dedicadas a la cría de ciervo Ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*). Esta subespecie de ciervo rojo es originaria de la Península Ibérica y su valor genético es reconocido a nivel mundial y apreciado por cazadores de todos los países [2].

Debido al dimorfismo sexual que presenta la especie, sólo el macho posee trofeo cinegético y sobre éste recae el interés de los cazadores [17,18]. Este hecho hace que los productores de ciervo Ibérico reciban fundamentalmente los ingresos de la venta de machos para las repoblaciones de cotos de caza. En este sentido, es importante destacar que para la industria española de cría y caza de ciervo Ibérico es de un incalculable valor la reintroducción del material genético de los venados abatidos (especialmente de los que poseen las mejores cuernas) mediante el uso de su material espermático obtenido del epidídimo y congelado para su posterior aplicación mediante TRA [19,20]. Este procedimiento permite la difusión de material genético de animales con gran trofeo [1,2,21] pues la cuerna es un carácter que presenta una alta heredabilidad [18], mejorando el valor de los cotos de caza y de granjas, y evitando que con la muerte del animal se pierda su potencial genético. En este contexto, para las explotaciones dedicadas a la cría de ciervo Ibérico, la PIVE presenta ciertos beneficios respecto a otras TRA como la IA o la obtención de embriones *in vivo*. En primer lugar, con el uso de la PIVE es posible incrementar el rendimiento tanto de muestras espermáticas de animales de gran mérito genético (incluidas las recogidas postmortem), como de muestras sexadas para la

producción exclusiva de machos. Así, el número de ovocitos que potencialmente pueden ser fecundados por dosis seminal es mucho mayor en la FIV que si la misma dosis es destinada a la IA de una sola hembra [22]. Además, debido a que durante la FIV los espermatozoides no deben atravesar las barreras anatómicas del tracto reproductor de la hembra para fecundar los ovocitos, la PIVE se presenta como una opción más conveniente para aplicar el semen sexado, el cual se caracteriza por presentar daños yatrogénicos asociados al propio proceso de separación, que reducen su fertilidad [23]. Asimismo, la PIVE asociada a la técnica de *Ovum pick-up* (OPU) permite aumentar la prolificidad de las ciervas [22], al igual que su aplicación con ovocitos procedentes de animales sacrificados, permite recuperar el material genético de hembras selectas tras el sacrificio [24].

Otros aspectos que hacen de la PIVE una técnica con mayor potencial en esta especie frente a otras TRA como la IA o la obtención de embriones *in vivo* están relacionados con la anatomía del aparato reproductor de las ciervas [8], con la susceptibilidad al estrés por manejo que presentan estos animales [25] y con la marcada estacionalidad reproductiva de la especie [26]. Por un lado, debido al tamaño y fragilidad del aparato reproductor de las ciervas (la pared del recto posee 1 mm de grosor [8]), la IA transcervical no es una técnica fácil de realizar, la cual se agrava en subespecies de menor envergadura como la Ibérica [27]. Este hecho provoca que no sea siempre posible realizarla y que, por tanto, tras un primer manejo fallido haya que recurrir a procedimientos más invasivos que requieren anestesia para conseguir depositar el semen en el útero. Por otro lado, en lo que se refiere a la conducta de estos animales, esta especie se caracteriza por una tendencia natural a estresarse [28], que se ve empeorada cuando son criados en cautividad pudiendo no habituarse nunca a los manejos y sufrir estrés crónico [25,29]. Como consecuencia, la aplicación de TRA que requieren la manipulación sucesiva de los animales se complica, convirtiéndose el estrés por manejo, previsiblemente, en uno de los factores que determinan el éxito de las mismas tras su aplicación [22,30]. Concretamente, la obtención de embriones *in vivo* ha sido asociada con, al menos, de siete a diez manejos

diferentes del animal y una o dos anestias (una para inseminación intrauterina y otra para recuperación de embriones) [31]. En comparación, el manejo de las ciervas ligado a la obtención de los ovocitos en la PIVE es nulo (ovocitos procedentes de animales sacrificados) o se limita al derivado de la técnica de OPU y es mucho menos invasivo, al prescindir de la inseminación de las hembras (transcervical o intrauterina) y la recuperación de los embriones [22]. Por último, debido a la marcada estacionalidad reproductiva de los cérvidos, en concreto de la subespecie Ibérica [26,32,33], la mayoría de los programas de IA o de obtención de embriones *in vivo* se realizan una única vez durante la primera parte de la época reproductiva de las ciervas [1,34], mientras que la PIVE no presenta estas restricciones. Todos estos hechos posicionan a la PIVE como la estrategia más atractiva para los ganaderos dedicados a la cría en cautividad de ciervo Ibérico con la que mejorar los rendimientos de sus explotaciones.

Para poder aprovechar las ventajas y el potencial que ofrece la PIVE en esta especie, es necesario mejorar y estandarizar los procedimientos que actualmente se utilizan en ciervo en cada una de las etapas que conforman la técnica, los cuales han sido extrapolados de otras especies de rumiantes, como la bovina, ovina y caprina [5], como ha sido mencionado anteriormente. Una de las fases que requiere ser optimizada es la de capacitación espermática *in vitro*, mediante la cual los espermatozoides adquieren la capacidad fecundante a través de incubaciones en medios y bajo condiciones que imitan a las que el oviducto proporciona, pues es ahí donde ocurre de manera fisiológica la fecundación [35,36]. Los espermatozoides, a pesar de ser motiles y morfológicamente maduros inmediatamente después de ser eyaculados, necesitan desarrollar una serie de eventos fisiológicos para poder fecundar el ovocito [37,38]. Funcionalmente, la capacitación espermática se asocia con cambios en el patrón de motilidad de los espermatozoides y con su capacidad para experimentar la reacción acrosómica [39]. A nivel molecular, la capacitación está asociada a la hiperpolarización de la MP a través de la activación de varios canales iónicos que provocan el aumento de la concentración intracelular de iones como el K^+ y HCO_3^- incrementando el pH [40–42]. Este aumento del pH intracelular,

activa los canales de Ca^{2+} lo que conduce al incremento de su concentración en el espermatozoide durante la capacitación y la reacción acrosómica [43]. Por otra parte, el HCO_3^- tiene un importante papel en la reorganización de los lípidos de la MP que inducen la pérdida de colesterol, el cual es captado por la albúmina [44,45]. Otro evento que produce la entrada de HCO_3^- y Ca^{2+} en el espermatozoide, es la activación de vías de señalización responsables de los cambios en el estado de fosforilación de varias proteínas en residuos de tirosina, serina y treonina [46]. Así, el ingreso de ambos iones produce la activación de la adenil ciclasa soluble (sAC) aumentando la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y activando la proteína quinasa A (PKA) que está asociada con la fosforilación en tirosina que caracteriza a la capacitación espermática [47–49].

En especies de pequeños rumiantes, la capacitación es promovida mediante el tratamiento de los espermatozoides con ESS [7]. Aunque a día de hoy no se conocen bien los mecanismos mediante los cuales el ESS estimula la capacitación espermática, ha sido demostrado que su presencia en los medios facilita cambios compatibles con la capacitación como la salida del colesterol de la MP así como el aumento de la fosforilación en tirosina en espermatozoides de ciervo y ovino [50–52]. Hasta la fecha, no se conoce ninguna otra sustancia que permita obtener resultados de capacitación y fecundación similares a los conseguidos mediante el uso del ESS en pequeños rumiantes [53]. Sin embargo, el diseño de medios que eliminen la presencia de ESS serían esenciales para desarrollar y estandarizar los protocolos para la PIVE en ciervo. Así, aunque el uso de sueros y de fluidos de origen animal es habitual en las TRA, su uso presenta una serie de inconvenientes [54]. Por una parte, la composición de los sueros y fluidos es compleja y variable [55] lo que genera diferentes respuestas celulares cuando son empleados en los protocolos de PIVE [56]. Este hecho provoca que los resultados varíen entre laboratorios, disminuyendo la reproducibilidad y el progreso de la técnica. Además, el suero es una fuente de contaminantes microbiológicos [54] y genera problemas de seguridad sanitaria para el personal de laboratorio [57–59]. Por otro lado, debido a que es un recurso limitado, su

disponibilidad no está siempre garantizada y es necesario reemplazarlo periódicamente. A todo esto, se le añade que, en los últimos años, diversas instituciones europeas han promovido evitar el uso de productos derivados de animales en estudios *in vitro* siempre que sea posible [60].

En lo que a la capacitación y producción embrionaria se refiere, varios estudios han reportado las diferentes respuestas obtenidas cuando, en los protocolos de capacitación y FIV de pequeños rumiantes, los medios empleados son suplementados con suero. Concretamente en ciervos, se ha reportado una capacidad diferente para promover la fosforilación en tirosina asociada a la capacitación por parte de sueros extraídos de ciervas y ovejas, a pesar de que ambos fueron obtenidos durante la fase estral de sus ciclos reproductivos [50]. En cuanto a sus efectos sobre el embrión, en especies como la ovina se han reportado diferencias en el desarrollo embrionario cuando el suero es utilizado en la fase de cultivo *in vitro* [10,61–63]. La diferente composición de los sueros podría estar detrás de esta variabilidad en la respuesta obtenida. En este sentido, la composición del suero de oveja es dependiente de factores tales como la dieta, edad, estrés, época del año o localización de los animales y tiene un fuerte componente genético observándose diferencias entre razas y especies [55]. A pesar de estos antecedentes y a que el reemplazo de distintos ESS es habitual cuando se realiza de forma continuada la PIVE en estas especies, todavía no se ha demostrado si el uso de distintos sueros puede afectar a la capacitación espermática, así como a la producción y calidad embrionaria cuando son utilizados en los medios de capacitación y FIV.

Otro aspecto determinante para conseguir una CIV exitosa es el relacionado con la duración de la incubación de los espermatozoides en condiciones capacitantes. Así, la CIV, aunque es esencial para que el espermatozoide adquiera la capacidad para fecundar el ovocito, desencadena con el tiempo la muerte celular por tratarse de un proceso continuo de desestabilizaciones [45]. Este hecho conlleva que, si el tiempo de incubación excede aquel que los espermatozoides requieren para capacitarse, la probabilidad de fecundar un ovocito puede verse reducida debido a la pérdida de sus funciones [64,65]. Sin embargo, de la misma manera,

si los espermatozoides no tienen tiempo suficiente para completar los procesos de capacitación antes del inicio del envejecimiento de los ovocitos, la probabilidad de generar un embrión disminuirá debido a la degeneración de los mismos [66]. Estos hechos demuestran que bajo condiciones *in vitro*, las asincronías entre los gametos pueden conducir al fracaso en la fecundación y ponen de manifiesto la importancia de la correcta programación de la capacitación espermática y el inicio de la co-incubación con los ovocitos. En concreto, este aspecto adquiere mayor relevancia con el uso de espermatozoides descongelados, que en especies como el ciervo es lo más habitual debido a que no es frecuente que los animales se encuentren cerca de los laboratorios donde se lleva a cabo la PIVE. La congelación espermática produce daños subletales como la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés *reactive oxygen species*), modificaciones en la composición y permeabilidad de la MP, o el deterioro de la actividad mitocondrial que acortan la vida de los espermatozoides tras la descongelación [67,68]. Además, la población de espermatozoides que sobreviven al proceso de criopreservación, experimenta modificaciones similares a las que ocurren durante la capacitación (criocapitación) [69,70]. Esta condición de los espermatozoides tras la descongelación podría acelerar la capacitación en ciervos como ocurre en otras especies de pequeños rumiantes [52,71–73] y precipitar los eventos de muerte celular que reduzcan el potencial fecundante de la muestra. Sin embargo, hasta la fecha no existe información sobre la cinética de los fenómenos que ocurren durante la capacitación con el uso de semen congelado de ciervo lo que complica adaptar el protocolo de capacitación para la PIVE en esta especie. Por este motivo, para la optimización de la PIVE de ciervos es imprescindible monitorizar los eventos que ocurren durante la capacitación espermática *in vitro* para ajustar el comienzo de la co-incubación de los espermatozoides con los ovocitos de la manera más precisa.

A la luz de los retos científicos, legislativos, sanitarios y de suministro que conlleva el uso de suero, los medios conocidos en la bibliografía como *serum-free* (SF; elaborados sin suero) representan la alternativa más adecuada a implementar en los protocolos de capacitación

espermática para la FIV de ciervos. Éstos permitirían solventar la creciente presión legislativa orientada a eliminar componentes de origen animal en los medios de cultivo celular, así como el resto de los inconvenientes del suero mencionados. Sin embargo, el uso de este tipo de medios para la capacitación y FIV de ciervos, en vez de los suplementados con ESS, afectó negativamente a los porcentajes de fecundación [74–77], o bien redujo el número de embriones producidos de un 20 % con el uso de ESS [78] a un 5 % sin él [79]). Esto pone de manifiesto que son necesarios más trabajos en esta línea que permitan diseñar un medio SF más adaptado a la fisiología de los espermatozoides y ovocitos de esta especie.

Dado que fisiológicamente los espermatozoides experimentan la capacitación bajo la influencia del fluido oviductal, replicar su composición ha sido el objetivo principal en los intentos por establecer un medio adecuado de CIV. Si bien existen diferencias entre especies en los componentes del fluido oviductal, la presencia de albúmina sérica bovina (BSA), Ca^{2+} y HCO_3^- en los medios de capacitación es común en la mayoría de los mamíferos estudiados debido esencialmente a su capacidad para promover los eventos moleculares que lleva asociados la capacitación [35,80,81]. Así, la BSA actúa como un aceptor del colesterol, eliminándolo de la MP de los espermatozoides lo que la hace más fluida y permeable al Ca^{2+} y HCO_3^- en espermatozoides de ovino, ratón y cerdo [82–84]. Ambos electrolitos (Ca^{2+} y HCO_3^-) activan la vía de señalización del AMPc que es considerada la vía fundamental en la coordinación de los procesos asociados a la capacitación espermática [48]. Así, con la entrada de ambos iones al espermatozoide la producción de AMPc se incrementa y con ella la actividad de la PKA que desencadena la fosforilación en tirosina de numerosas proteínas [85–87]. Simultánea a la activación del eje AMPc/PKA, se produce el aumento del desorden de fosfolípidos de la MP, la cual permite la posterior salida del colesterol de su estructura mediante aceptores como la albúmina [82,88]. Por su parte, el pH del medio también tiene un papel clave en la estimulación del proceso de capacitación modulando el pH intracelular de los espermatozoides de toro, ratón o caballo [80,89,90], el cual, durante la capacitación, aumenta

y estimula la fosforilación en tirosina y la entrada de Ca^{2+} necesaria para que ocurra posteriormente la reacción acrosómica [91]. No obstante, aunque estos eventos moleculares han sido estudiados y reportados en numerosas especies, la información disponible en ciervo es prácticamente nula. Así, el único reporte de cambios moleculares asociados a la capacitación en esta especie es el realizado por Tulake et al. quienes observaron que la incubación de los espermatozoides con ESS promueve el incremento de la fosforilación de tirosina [50]. Sin embargo, poco se conoce sobre el efecto del Ca^{2+} y HCO_3^- ni del pH sobre la fisiología espermática ni qué concentraciones o condiciones de pH son las más convenientes para desencadenar los cambios asociados a la capacitación reportados en otras especies. Los resultados obtenidos de este tipo de estudios permitirían diseñar un medio de capacitación espermática, en el que el ESS no estuviera presente, para llevar a cabo con éxito la PIVE en ciervo.

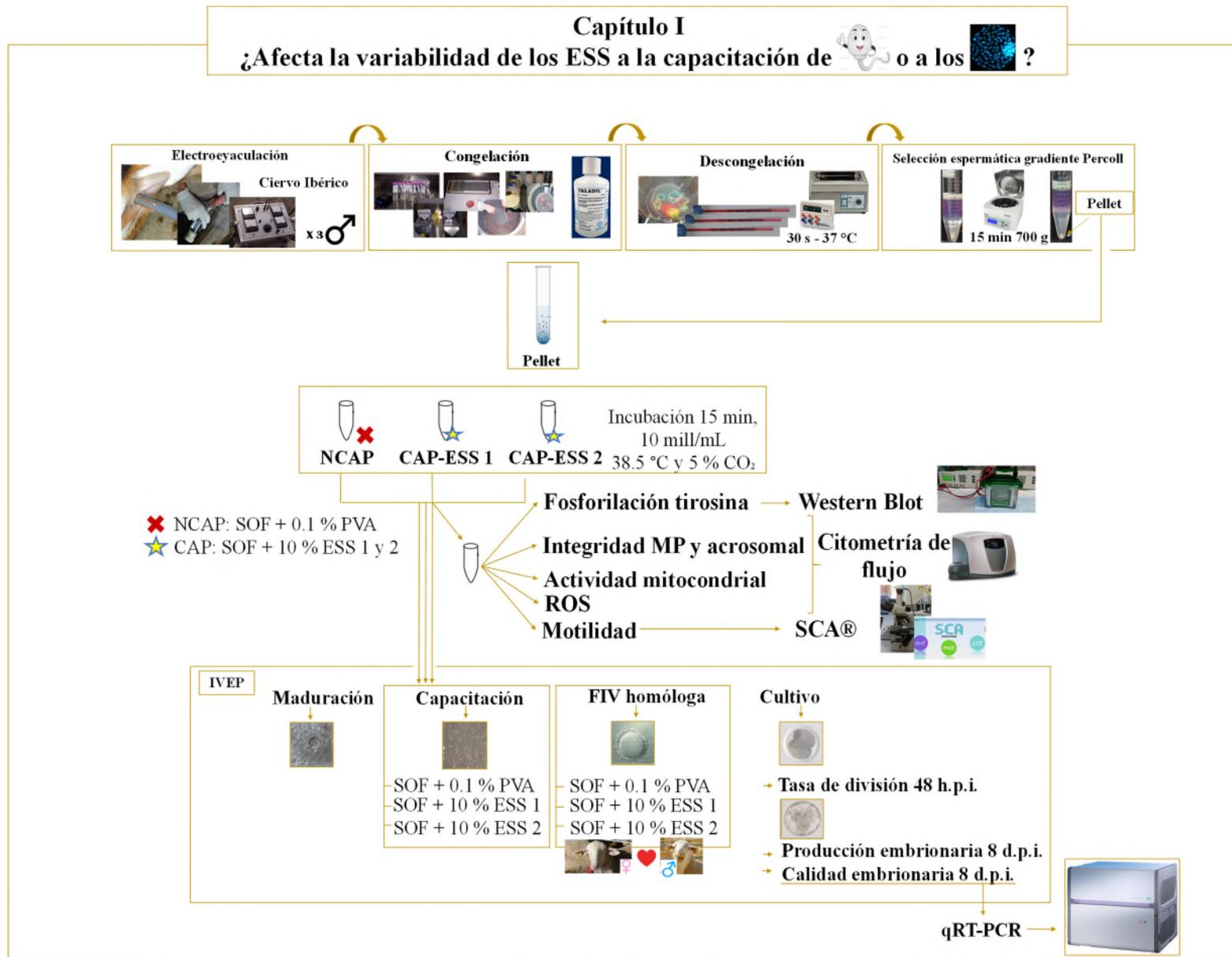
OBJETIVOS

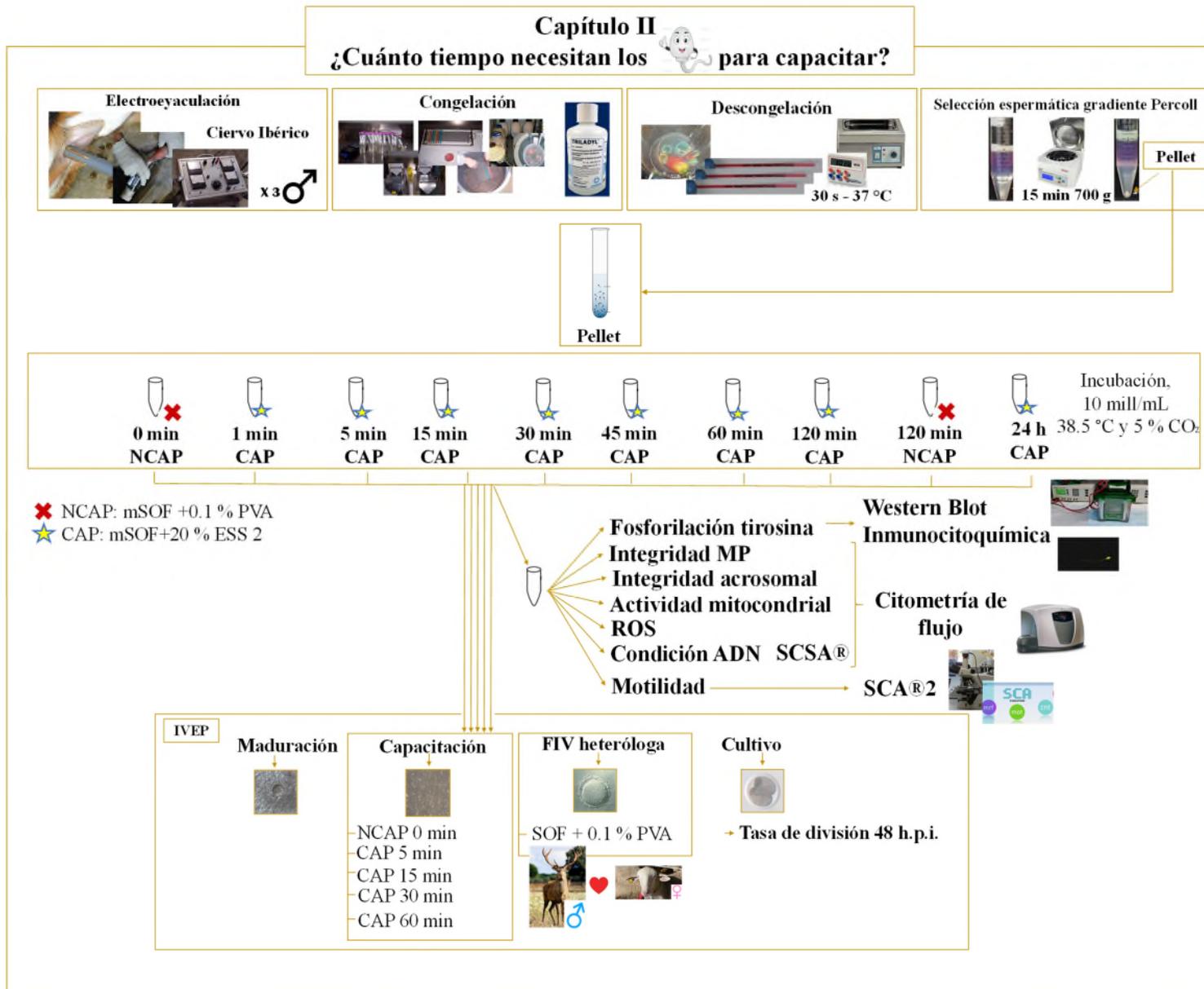
Objetivos

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar por primera vez el comportamiento de los espermatozoides descongelados de ciervo Ibérico durante la CIV y mejorar los protocolos empleados en esta fase de la producción *in vitro* de embriones (IVEP). Para ello se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el efecto de distintos sueros de oveja en celo (ESS) sobre la capacitación y la fecundación, así como sobre la calidad de embriones producidos *in vitro* en términos de expresión génica, utilizando como modelo animal la especie ovina.
2. Caracterizar el comportamiento de los espermatozoides descongelados de ciervo Ibérico durante la incubación en condiciones de capacitación.
3. Identificar el tiempo óptimo de incubación en condiciones de capacitación de espermatozoides descongelados de ciervo Ibérico para mejorar las tasas de FIV de ovocitos.
4. Estudiar del efecto de diversas concentraciones de BSA sobre espermatozoides descongelados de ciervo Ibérico como alternativa al uso de ESS para la capacitación espermática en esta especie.
5. Diseñar un medio de capacitación libre de ESS para espermatozoides descongelados de ciervo Ibérico modificando diferentes componentes (Ca^{2+} y NaHCO_3) y distintos pHs, para ser utilizado en la IVEP en esta especie.

DISEÑO EXPERIMENTAL





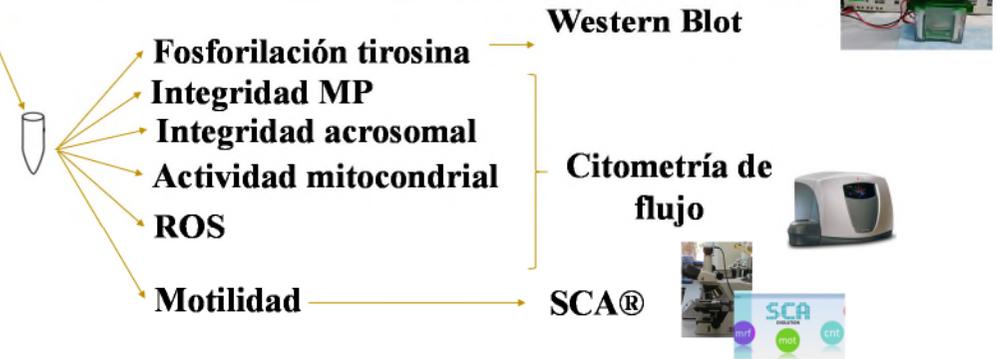
Capítulo III ¿Puede ser la BSA una alternativa al ESS?

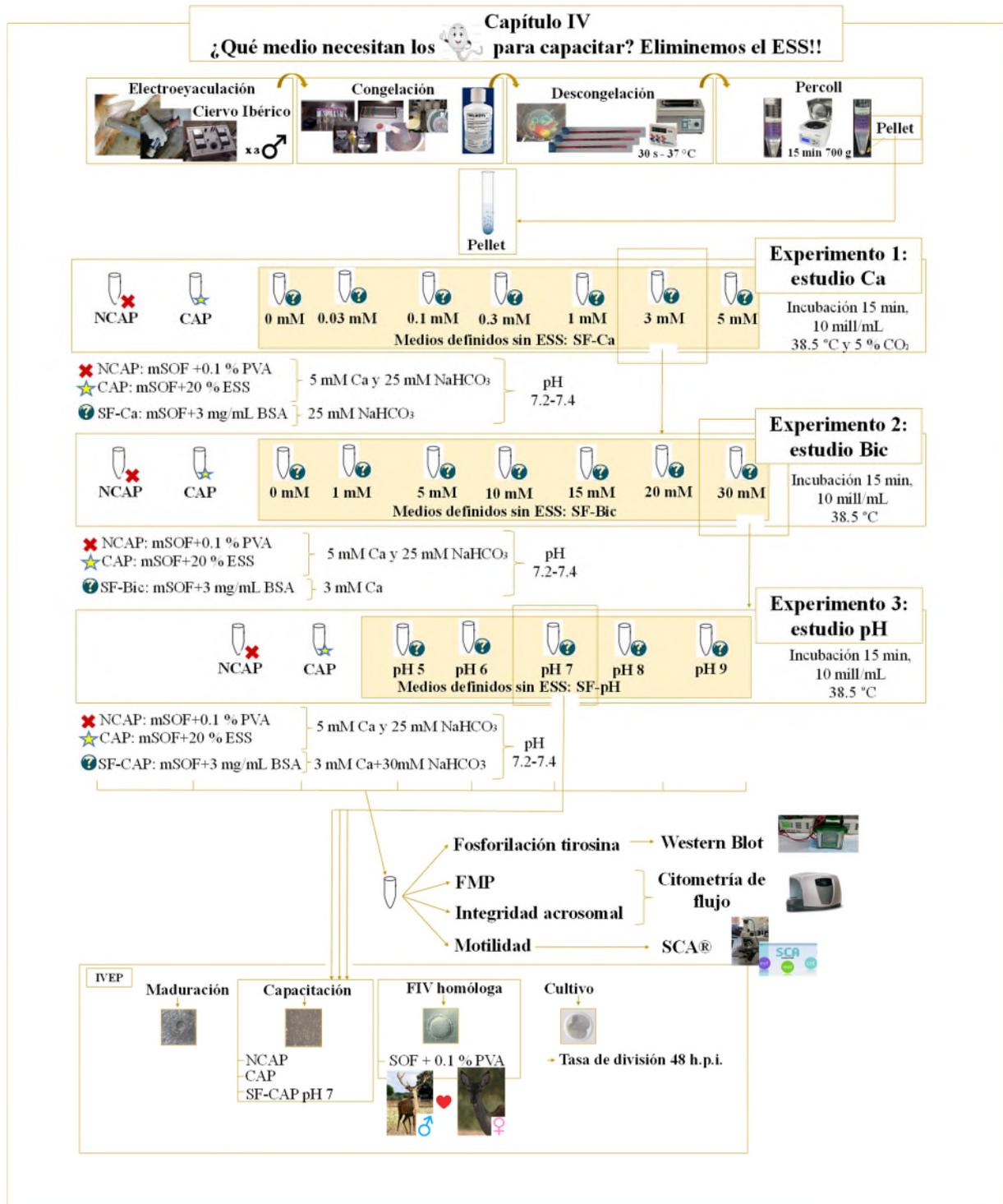


Estudio de la BSA



✖ NCAP: mSOF +0.1 % PVA
 ★ CAP: mSOF+20 % ESS





CAPÍTULO I

**Efecto de la variabilidad individual del suero de oveja en celo
cuando se utiliza como agente capacitante en un sistema de
fecundación *in vitro* sobre los cambios funcionales y moleculares
de los espermatozoides de ovino**

Resumen

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar y comparar el efecto del ESS obtenido de diferentes hembras sobre las características funcionales y moleculares de los espermatozoides de ovino, utilizado como modelo experimental, así como sobre la actividad transcripcional de los embriones producidos. Para ello, se obtuvo ESS de dos ovejas (ESS 1 y ESS 2) a las que previamente se les indujo el celo de forma artificial. Posteriormente, espermatozoides de tres moruecos adultos fueron descongelados y procesados conjuntamente, dividiendo las muestras espermáticas en 3 partes. Dos partes fueron diluidas en un fluido sintético oviductal (SOF) suplementado con 10 % de cada ESS (CAP-ESS 1 y CAP-ESS 2), la otra parte fue diluida en un medio sin ESS (NCAP) utilizado como control. Tras la dilución, todas las muestras espermáticas fueron incubadas durante 15 min en 5 % CO₂ a 38.5 °C. Parámetros espermáticos relacionados con la motilidad evaluados con sistemas computarizados de imágenes (CASA), la integridad de la membrana acrosomal y de la MP, la actividad mitocondrial y la producción de especies reactivas de oxígeno evaluados con citometría de flujo, así como la fosforilación en residuos de tirosina de proteínas evaluados mediante Western-Blot fueron determinados tras la incubación. Además, se realizó un test de FIV utilizando los diferentes ESSs en el medio de capacitación y fecundación y se estudió la expresión génica de los blastocistos obtenidos mediante qPCR. El tipo de suero utilizado para capacitar los espermatozoides no tuvo influencia sobre los parámetros de motilidad evaluados, aunque los valores de VCL y ALH fueron menores para las muestras capacitadas comparadas con las no capacitadas. Igualmente, la viabilidad, el porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos, con mitocondrias activas y con estrés oxidativo no fue diferente entres sueros, pero los valores para estos tratamientos fueron menores ($P < 0.05$) respecto a las muestras no capacitadas. La adición de suero provocó una mayor fosforilación en residuos de tirosina respecto al medio que no contenía suero, aunque

no existieron diferencias entre sueros entre las bandas estudiadas, excepto para aquellas proteínas comprendidas entre 32-37 KDa con una mayor fosforilación para el ESS 1. En relación a los embriones producidos, se observó que con el medio sin suero no se obtuvieron embriones. Además, no encontramos diferencias entre sueros para el porcentaje de embriones producidos, así como tampoco observamos diferencias en los niveles de expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo (*SOD 2*), factores de transcripción (*TP 53*), procesos apoptóticos (*BAX*), implantación y metabolismo (*AKR1B1*) y uniones GAP (*GJA1*), estudiados en ellos. Teniendo en cuenta nuestros resultados, serían necesarios más estudios para comprender el efecto que tiene la presencia de ESS en celo en los medios de FIV utilizados en ovino sobre las células germinales y embriones.

Introducción

El uso de sueros y de fluidos de origen animal es habitual en los protocolos de diferentes TRAs. Estas sustancias, o componentes presentes en ellas como la albúmina sérica bovina (BSA), se emplean en diferentes fases de la técnica de FIV. En pequeños rumiantes, el suero fetal bovino (FCS) o el fluido folicular son componentes habituales en los medios para la maduración de los ovocitos, el ESS en los medios de capacitación espermática y fecundación, mientras que la BSA es utilizada durante el cultivo embrionario [92,93]. Hasta la fecha, los mejores resultados de producción de embriones *in vitro* en la especie ovina se han conseguido mediante el uso de ESS en los medios de capacitación y fecundación [53].

La capacitación espermática ha sido definida como el conjunto de modificaciones que experimentan los espermatozoides para adquirir la capacidad de fecundar un ovocito [38,94]. Este proceso, está asociado en el espermatozoide con la modificación de los lípidos de la MP y pérdida de colesterol, aumento de las concentraciones de Ca^{2+} y del pH intracelular, aumento de la cantidad de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina [48], adquisición del movimiento de hiperactivación, y culmina con la pérdida del acrosoma [95]. En condiciones fisiológicas, la capacitación ocurre en el tracto reproductor de la hembra [39], sin embargo, este proceso puede inducirse *in vitro* y se ha demostrado que el fluido oviductal es un potente agente capacitante [96,97]. La secreción oviductal es un fluido complejo formado por componentes que proceden de las células epiteliales y del plasma sanguíneo [98], por lo que es muy probable que aquellos compuestos del fluido oviductal responsables de la capacitación espermática estén presentes en el suero. Así, la incubación de espermatozoides de morueco en presencia de ESS, induce cambios compatibles con la capacitación como son la adquisición del movimiento hiperactivado, el aumento del desorden de fosfolípidos de la por la salida del colesterol, y el

incremento de la fosforilación en residuos de tirosina, además de promover la reacción acrosómica y permitir la fecundación de los ovocitos [52,53,99].

Estudios previos señalan que uno de los principales problemas del uso de sueros es que son muy variables respecto a su calidad, ya que se ha demostrado que su composición y su efecto depende del sexo [56,100] y del estado fisiológico del individuo del que se extrae [101,102], así como del lugar y la época de recogida [103]. Además, aunque los sueros son habitualmente calentados durante 30 min a 57 °C para inactivar el complemento, este procedimiento no garantiza la inactivación de componentes tóxicos pudiendo reducir, sin embargo, factores beneficiosos para los gametos y el embrión. Por otra parte, el suero puede ser una fuente de contaminantes microbiológicos y causar problemas de seguridad sanitaria para el personal de laboratorio [57–59]. Además, la cantidad de suero que se obtiene por individuo es limitada y por lo tanto el reemplazo de sueros es una rutina periódica en los laboratorios donde se desarrollan TRA en estas especies.

Esta variabilidad inherente de los sueros ha sido observada en algunos trabajos en los que diferentes sueros han sido utilizados para capacitar *in vitro* espermatozoides. Así, sueros obtenidos de hembras sometidas a diferentes tratamientos hormonales y varios medios comerciales utilizados para la FIV tuvieron diferente efecto sobre los patrones y niveles de fosforilación en residuos de tirosina en los espermatozoides de porcino y humano [102,104]. También ha sido reportado el efecto que pueden ejercer los sueros empleados durante el cultivo *in vitro* sobre el desarrollo y la calidad de los embriones producidos en términos de expresión génica [61,63,105], inhibiendo en algunos casos la primera división cigótica y el crecimiento celular, así como las posibilidades de supervivencia al nacimiento una vez transferidos [56,62,106].

Sin embargo, hasta la fecha no se ha estudiado en especies de pequeños rumiantes si la respuesta a la capacitación de los espermatozoides puede ser diferente en función del ESS empleado. Tampoco se ha evaluado el efecto que diferentes ESSs utilizados en la co-incubación de los gametos durante la FIV pudieran tener sobre la producción y calidad de los embriones generados.

Por todo ello, el objetivo de nuestro estudio fue evaluar el efecto de diferentes ESSs obtenidos de distintas hembras sobre los cambios funcionales y moleculares en los espermatozoides de ovino, así como sobre la producción y calidad embrionaria tras utilizarlos durante la capacitación espermática y la fase de FIV.

Materiales y métodos

1. Reactivos

Salvo que se indique lo contrario, todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Madrid, España). Los fluorocromos fueron obtenidos de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, USA) y el aceite mineral de NidOil™ (Nidacon International, Suecia).

2. Recogida y criopreservación espermática

Las muestras espermáticas provenían del Banco de germoplasma de la Universidad de Castilla-La Mancha (ES07RS02OC) siguiendo el RD 841/2011. Se utilizaron muestras espermáticas de 3 moruecos adultos (> 2 años de edad) de la raza ovina Manchega cuyos eyaculados fueron obtenidos mediante vagina artificial. Inmediatamente tras la recogida, la motilidad individual (0-100%) y masal (0-5) fue evaluada de forma subjetiva por microscopia (Eclipse 50i Nikon; Tokio, Japón). Solo fueron congelados aquellos eyaculados que presentaban una motilidad individual superior a 65% y una motilidad masal por encima de 3.5.

Las muestras espermáticas fueron diluidas hasta una concentración final de 200×10^6 espermatozoides mL^{-1} en un diluyente Biladyl® (Minitüb, Tiefenbach, Alemania) suplementado con 20 % (v/v) de yema de huevo y 7 % de glicerol. Las muestras diluidas fueron enfriadas lentamente (desde 30 °C a 5 °C) durante 2 h y mantenidas a 5 °C durante 2 h. Tras este período, las muestras fueron envasadas en pajuelas de 0.25 mL (Minitüb, Tiefenbach, Alemania) y congeladas en un biocongelador programable (Planer Kyro 10 Series III; Planer PLC, Londres, Reino Unido) según una curva de congelación establecida ($-20 \text{ }^\circ\text{Cmin}^{-1}$ desde 5 °C hasta $-100 \text{ }^\circ\text{C}$ y $-10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ desde $-100 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta $-140 \text{ }^\circ\text{C}$). Posteriormente, las pajuelas fueron sumergidas en nitrógeno líquido, donde permanecieron almacenadas hasta su utilización.

3. *Obtención del suero de oveja en celo*

El ESS se obtuvo a partir de 2 ovejas (ESS 1 y ESS 2) cuyo estro fue inducido artificialmente mediante dispositivos intravaginales impregnados con 20 mg de cronolona (Chronogest CR®, MSD Animal Health) que fueron administrados y mantenidos durante 14 días. En el momento de la retirada de estos dispositivos, se le administró 400 UI de gonadotrofina coriónica equina (Folligon®, MSD Animal Health) a cada oveja. La aparición del celo fue detectada realizando una observación continua de los animales y utilizando machos vasectomizados con un sistema de marcación. Una vez las ovejas estuvieron marcadas, se les extrajo 200 ml de sangre de la vena yugular, la cual se mantuvo a 4 °C durante toda la noche. A las 12 h tras la recogida, se retiró el coágulo y el suero obtenido fue centrifugado a 4 500 rpm durante 1 h para eliminar el mayor número de células sanguíneas presentes. A continuación, se retiró el sobrenadante y el suero fue calentado hasta alcanzar los 56 °C y fue mantenido a esta temperatura durante 30 min en un baño térmico-con el objetivo de inactivar las proteínas del complemento [56,107–109]. Inmediatamente después, se transfirió a un baño con hielo picado y fue alicuotado y almacenado a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su utilización.

4. *Diseño experimental*

Para eliminar diferencias individuales, se descongelaron y procesaron conjuntamente muestras espermáticas de tres moruecos. La descongelación de las pajuelas se realizó mediante inmersión en un baño térmico con solución salina fisiológica a 37 °C durante 30 s. A continuación, se realizó una centrifugación en un gradiente de diferente densidad de Percoll[®] (45%/90%) a 700 g durante 10 min con el objetivo de eliminar el plasma seminal, el diluyente de congelación y aumentar la proporción de espermatozoides viables [53]. Tras la centrifugación, el sobrenadante fue retirado y el pellet fue dividido en tres partes. Dos partes del pellet fueron diluidas en un SOF (Ver Anexo I) suplementado con un 10 % (v/v) de los diferentes ESS (CAP-ESS 1 y CAP-ESS 2). La parte restante del pellet fue diluida hasta la misma concentración espermática con SOF suplementado con 0.1 % (v/v) de alcohol de polivinilo (PVA) y fue utilizado como control negativo (NCAP).

Todas las muestras espermáticas fueron incubadas durante 15 min en un 5 % de CO₂ a 38.5 °C. Tras la incubación, se realizó la evaluación de diferentes parámetros espermáticos, así como un ensayo de FIV cultivando los embriones hasta el estado de blastocisto. Por último, se llevó a cabo el análisis de la expresión génica de los blastocistos obtenidos.

5. *Evaluación de parámetros de motilidad espermática objetiva*

La motilidad objetiva de los espermatozoides, diluidos en los diferentes medios (CAP-ESS 1, CAP-ESS 2 y NCAP) fue evaluada tras la incubación mediante el software Sperm Class Analyzer (SCA[®], Microptic 2002) como describió García-Álvarez et al. [53]. Se capturaron, al menos, 10 campos por muestra espermática utilizando una cámara Basler A302 fs digital (Basler Vision Technologies, Ahrensburg, Alemania) acoplada a un ordenador mediante un conector IEEE 1394. El tamaño de las imágenes fue de 768 x 576 píxeles. La velocidad de adquisición fue de 50 imágenes s⁻¹ y el tamaño de la cabeza de los espermatozoides se limitó a

un área comprendida entre 20-90 μm^2 . Para cada muestra, se registraron los siguientes parámetros: motilidad total (TM, %), definida como porcentaje de espermatozoides con una velocidad $> 10 \mu\text{m s}^{-1}$ según la trayectoria curvilínea; velocidad según la trayectoria curvilínea (VCL, $\mu\text{m s}^{-1}$); índice de linealidad (LIN, %); y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza de los espermatozoides (ALH; μm).

6. *Análisis de parámetros espermáticos mediante citometría de flujo*

La viabilidad espermática, la integridad del acrosoma, la actividad mitocondrial y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) fueron evaluadas como describió del Olmo et al. [110]. mediante un citómetro *FC500* (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) equipado con el software *MXP* (v.3). Los datos obtenidos fueron analizados con el software *WEASEL* (WEHI, Melbourne, Australia). En todos los análisis se analizaron 10 000 eventos por muestra espermática. Todos los fluorocromos fueron excitados con un láser de 488nm, mientras que el fluorocromo Mitotracker Deep Red fue excitado con un láser helio-neón de 633nm. La fluorescencia verde emitida por el naranja de acridina y los fluorocromos YO-PRO[®]-1, FITC y CM-H₂DCFDA fue detectada por el fotodetector FL-1 (filtro 530/28BP); la fluorescencia emitida por el Mitotracker Deep Red por el fotodetector FL-4 (675/40BP). Para eliminar cualquier otro tipo de células diferente de la población principal de espermatozoides, se utilizó un gráfico de puntos de la dispersión de la luz frontal vs. lateral.

Las muestras espermáticas fueron diluidas hasta una concentración de $1 \cdot 10^6$ espermatozoides mL^{-1} en las diferentes soluciones de tinción (descritas a continuación) preparadas en un medio SOF suplementado con 0.1 % (p/v) de PVA y HEPES (2.35 mg mL^{-1}).

Para la evaluación de la viabilidad espermática se utilizó la combinación de los fluorocromos yoduro de propidio (IP; $12 \mu\text{M}$ (stock: $7,5 \text{ mM}$ en agua desionizada)) y YO-PRO[®]-1 (50 nM (stock: 1 mM en DMSO)). La población de espermatozoides IP-/YO-PRO-1-

fue considerada como espermatozoides viables; la población IP-/YO-PRO-1+ como espermatozoides apoptóticos; y la población IP+/YO-PRO-1+ fue considerada como espermatozoides no viables (muertos).

La integridad del acrosoma se evaluó mediante la combinación de los fluorocromos PNA-FITC ($3 \mu\text{g mL}^{-1}$ (stock: $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de agua desionizada)) e IP ($12 \mu\text{M}$ (stock: $7,5 \text{ mM}$ en agua desionizada)). La población de espermatozoides PNA-FITC-/IP- fue considerada como espermatozoides viables con acrosomas intactos.

La actividad mitocondrial fue analizada con el fluorocromo MitoTracker® Deep Red ($0,1 \mu\text{M}$ (stock: 1 mM en DMSO)) en combinación con YO-PRO®-1 (50 nM (stock: 1 mM en DMSO)). La población de espermatozoides MitoTracker+ / YO-PRO-1- fue considerada como espermatozoides viables con mitocondrias activas.

La producción de ROS fue evaluada con el fluorocromo CM-H₂DCFDA ($5 \mu\text{M}$ (stock: 2 mM en DMSO)) en combinación con IP ($12 \mu\text{M}$ (stock: 7.5 mM en agua desionizada)). La población principal de espermatozoides viables (IP-) incubados en medio NCAP al inicio de la incubación (0 min) fue establecida por debajo de la primera década en la escala logarítmica del fotodetector FL-1 (filtro 530/28BP) como valor de referencia en el histograma. A partir de esta configuración, los niveles de ROS fueron representados como el valor medio de la fluorescencia de CM-H₂DCFDA dentro de la población de espermatozoides IP- en cada muestra espermática.

7. *Análisis de la fosforilación de los residuos de tirosina*

La fosforilación en residuos de tirosina de proteínas fue analizada en las muestras espermáticas, diluidas en los diferentes medios (CAP-ESS 1, CAP-ESS 2 y NCAP) e incubadas durante 15 min, mediante Western-Blot. Para ello, las proteínas fueron extraídas como había sido descrito por [111]. Tras añadir b-mercaptoetanol al 5 %, las muestras espermáticas se llevaron a ebullición durante 3 min. Los extractos de proteínas procedentes de $5 \cdot 10^6$ de espermatozoides

se cargaron en geles de poliacrilamida y se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE. Las proteínas se sometieron a electro-transferencia en membranas de PVDF (Bio-Rad) a 250 mA durante 120 min a 5 °C. Los sitios no específicos de las membranas se bloquearon durante 1 h en un tampón TBS (Ver Anexo I) con Tween[®] 20 al 0.1 % (v/v; T-TBS) suplementado con gelatina al 20 % (v/v) antes de llevar a cabo la incubación con el anticuerpo primario. Tras el bloqueo, las membranas fueron incubadas durante 1h a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (1:1000, Clon 4G10[®]; Millipore) en T-TBS. A continuación, fueron incubadas con el anticuerpo secundario (1:10000, Anti-mouse, HRP-linked antibody; Sigma Aldrich) en T-TBS en las mismas condiciones descritas anteriormente. Para descartar la influencia de las posibles diferencias en la cantidad de proteínas extraídas, las membranas se reutilizaron para su posterior incubación con el anticuerpo anti-tubulina. Para ello, con la intención de eliminar completamente las uniones de las proteínas adheridas a la membrana con el anticuerpo primario y secundario (stripping), la membrana se mantuvo durante 15 min en una solución (pH 6.5) compuesta de SDS al 2 % (p/v), 0.74 % (v/v) de b-mercaptoetanol, 62.5 mM Tris a 65 °C y en agitación. A continuación, las membranas fueron lavadas seis veces durante 5 min en T-TBS. Posteriormente, se realizó un bloqueo de los sitios no específicos de la membrana con leche al 5 % (p/v) en tampón T-TBS y las membranas fueron incubadas con el anticuerpo anti-tubulina (1:1000, Clon B-5-1-2; Sigma Aldrich) en T-TBS con leche al 2 % (p/v) durante 2 h a temperatura ambiente y con el anticuerpo secundario (1:10000, Anti-mouse, HRP-linked antibody; Sigma Aldrich) en T-TBS en las mismas condiciones.. Las membranas fueron reveladas mediante el C-DiGit Chemiluminescent Western Blot Scanner (LI-COR) y el posterior análisis de las imágenes digitalizadas utilizando el software Image Studio Lite V5 de Licor. Para comparar los resultados obtenidos en cada tiempo de incubación, las bandas de proteínas correspondientes a la fosforilación en tirosina se relativizaron a la señal de la tubulina,

se cuantificaron y normalizaron considerando el control negativo (NCAP) a los 0 min como valor unitario.

8. *Test de fecundación in vitro*

Para evaluar el efecto de los diferentes medios (CAP-ESS 1 y CAP-ESS 2) utilizados para la capacitación espermática y fecundación sobre la producción y la expresión génica de los embriones obtenidos, se llevó a cabo un ensayo de FIV. Para ello, los ovarios procedentes de ovejas adultas fueron recogidos en el matadero tras el sacrificio de los animales y transportados al laboratorio en una solución salina suplementada con penicilina (ver Anexo I) en un período máximo de 3 h. Los complejos cúmulus-ovocitos (CCOs) fueron obtenidos de los folículos tras realizar cortes en el ovario con la hoja de un bisturí depositando el contenido en un medio 199 (M4530) suplementado con HEPES (11.56 mM), heparina (2 $\mu\text{L mL}^{-1}$) y gentamicina (4 $\mu\text{L mL}^{-1}$), previamente equilibrado (5 % CO_2 a 38.5 °C).

Una vez obtenidos los COCs, estos fueron madurados *in vitro* como describió García-Álvarez et al. [53] en medio 199 suplementado con cisteamina (100 μM), FSH y LH (10 mg mL^{-1}), FCS (10 % (v/v)) y gentamicina (4 $\mu\text{L mL}^{-1}$) en 5% CO_2 a 38.5 °C. Tras 24 h, las células del cúmulus fueron eliminadas utilizando una pipeta. El medio utilizado para lavar los ovocitos fue un SOF suplementado con 0.1 % (v/v) de PVA. Posteriormente, los ovocitos (n = 395) fueron depositados en placas de 4 pocillos con 450 μL de cada medio (CAP-ESS 1, CAP-ESS 2 y NCAP), respectivamente.

Los espermatozoides descongelados de 3 moruecos fueron mezclados y seleccionados mediante centrifugación en un gradiente de diferente densidad de Percoll® (45%/90%) a 700 g durante 10 min. El sobrenadante fue retirado y el pellet fue dividido en 3 partes y diluido en cada uno de los medios (CAP-ESS 1, CAP-ESS 2 y NCAP) hasta una concentración de $10 \cdot 10^6$ espermatozoides mL^{-1} e incubado durante 15 min en un 5 % de CO_2 a 38.5 °C.

A continuación, se realizó la co-incubación de los espermatozoides con los ovocitos depositando para ello 1×10^6 espermatozoides mL^{-1} por pocillo durante 18 h en un 5 % de CO_2 , 5 % de O_2 a $38.5 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, los presuntos cigotos fueron lavados y transferidos a gotas de cultivo de $25 \text{ } \mu\text{L}$ de SOF suplementado con BSA (3 mg mL^{-1}) cubiertas por aceite mineral durante 8 días en un 5 % de CO_2 , 5 % de O_2 y 90 % de N_2 a $38.5 \text{ }^\circ\text{C}$. Tanto el porcentaje de ovocitos divididos (tasa de división), evaluado a las 48 horas post inseminación (h.p.i.), como el porcentaje de blastocistos, registrado a los 6, 7 y 8 días post inseminación (d.p.i.), fueron evaluados mediante estereomicroscopio (Nikon SMZ 1500) y fueron expresados respecto al número total de ovocitos. Todos los blastocistos expandidos se lavaron tres veces en PBS suplementado con PVA 0.1 % (p/v) y se congelaron rápidamente sumergiéndolos en nitrógeno líquido, almacenándose a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ para el análisis posterior de su ARNm.

9. *Extracción de ARN y transcripción inversa*

La abundancia relativa de los transcritos de ARNm se examinó en un total de 93 blastocistos expandidos (procedentes de las 4 réplicas de FIV). Los blastos pertenecientes al mismo grupo experimental se agruparon en tres grupos de aproximadamente diez embriones (tres réplicas por grupo; réplicas técnicas) para la extracción de ARNm. El ARN poli (A) se extrajo utilizando el Micro Kit Dynabeads[®] mRNA DIRECT[™] (Ambion[®], Thermo Fisher Scientific Inc., Oslo, Noruega) utilizando las instrucciones del fabricante con modificaciones menores [112]. Después de 10 min de incubación en tampón de lisis con los Dynabeads, se extrajo el ARN unido a Dynabeads con un imán y se lavó dos veces con tampón de lavado A y tampón de lavado B. Posteriormente el ARN se lavó con $28 \text{ } \mu\text{L}$ de Tris-HCl.

Inmediatamente después de la extracción, se realizó el protocolo de transcripción inversa (RT). Las muestras se calentaron a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min para desnaturalizar la estructura secundaria de ARN. La reacción RT se realizó posteriormente usando *primer* de oligodT,

hexámeros de nucleótidos aleatorios y una enzima transcriptasa inversa derivada de MMLV modificada con RNasa H + (kit de síntesis de ADNc iScript™, Biorad) en un volumen total de 40 µL. Para completar este procedimiento, se agregó a cada muestra 4 µL de mezcla de reacción iScript (5x), 1 µL de transcriptasa inversa iScript y 7 µL de agua libre de nucleasas. Posteriormente, los tubos se incubaron a 25 °C durante 10 min, seguido de 30 min a 42 °C y finalmente a 85 °C durante 5 min. Se incluyó un control negativo de ADNc (sin muestra) y un control sin RT (sin enzima) como reacciones de control.

10. *PCR en tiempo real*

Las reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) se llevaron a cabo en un termociclador Roche LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Suiza) con capacidad para placas de 96 pocillos. En cada uno de ellos, se cargaron 20 µl de la siguiente mezcla de reacción: 2 µl de cDNA, 10 µl de PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y 400 nM de oligonucleótidos específicos directos (*primer forward*) e inversos (*primer reverse*; Tabla 1) y agua libre de nucleasas. El programa de PCR consistió en una primera incubación de 2 min a 50 °C y otros 2 a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. Se incluyó un control negativo (NTC) por cada mezcla de reacción para descartar posibles contaminaciones cruzadas entre muestras. Después de cada qPCR se analizaron las curvas de disociación o fusión (*melting*) con el software LightCycler® 480 para identificar los productos específicos de la PCR, teniendo en cuenta que estos se disocian a una temperatura más alta que los artefactos como dímeros de *primer* [113]. El *melting* se inició a 65 °C y terminó en 95 °C, con incrementos de 1 °C en cada paso, con 5 s de espera entre cada uno. Las medidas se realizaron por triplicado en un total de tres muestras por grupo experimental.

El análisis de los datos se realizó mediante el método del ciclo umbral comparativo [114]. En este método, la fluorescencia es adquirida al final de cada ciclo para determinar el ciclo umbral (*Cycle threshold*, Ct) o ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se eleva por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción de la PCR. En otras palabras, el valor Ct está representado por el ciclo en el cual la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido (Bustin, 2005). En esta zona, una diferencia de un ciclo equivale al doble de cantidad del producto amplificado obtenido en la PCR. En cada muestra, los valores fueron normalizados frente a la cantidad de DNA presente en la muestra a partir de los valores Ct del gen a evaluar y los del gen de referencia, en nuestro caso el *H2AFZ* (Δ Ct). De la misma forma, la relativización de cada grupo experimental se determinó utilizando el Δ Ct más alto de los grupos analizados como constante arbitraria para ser sustraída del Δ Ct del resto de las muestras ($\Delta\Delta$ Ct), aplicando posteriormente ese valor a la fórmula $2^{-\Delta\Delta$ Ct}. Los genes evaluados fueron los siguientes: H2A histone family, member Z (*H2AFZ*); Aldo-keto reductase family 1, member B1 (*AKR1B1*); BCL2-associated X protein (*BAX*); B-cell CLL/lymphoma 2 (*BCL2*); Gap junction protein, alpha 1 (*GJAI*); Glutathione peroxidase 1 (*GPXI*); Insulin-like growth factor-II receptor (*IGF2R*); Integral membrane protein 2B (*ITM2B*); Nuclear respiratory factor 1 (*NRF1*); Mitochondria polymerase gamma 2 accessory subunit, (*POLG2*); SHC-transforming protein 1 (*SHC1*); Mitochondrial Mn-superoxide dismutase (*SOD2*); Tumor protein 53 (*TP53*). Las secuencias de los *primers*, los números de acceso y los tamaños aproximados de los fragmentos amplificados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Especificaciones de los *primers* empleados para la qPCR.

	Nombre del gen	Gen	Secuencia del Primer (5'-3')	Base de pares	Nº de acceso al banco de genes (NCBI)
Estres oxidativo	Mitochondrial Mn-superoxide dismutase	<i>SOD2</i>	F-GCTTACAGATTGCTGCTTGT	101	NM_201527.2
			R-AAGGTAATAAGCATGCTCCC	101	NM_201527.2
	SHC-transforming protein 1	<i>SHC1</i>	F-GTGAGGTCTGGGCAGAAGC	335	NM_105305.2
			R-GTTTCGGACAAAAGGATCACC	335	NM_105305.2
	Glutathione peroxidase 1	<i>GPX1</i>	F-GCAACCAGTTTGGGCATCA	116	NM_174076.3
			R-CTCGCACTTTTCGAAGAGCATA	116	NM_174076.3
Implantación y metabolismo	Aldo-keto reductase family 1, member B 1	<i>AKR1B1</i>	F-CGTGATCCCCAAGTCAGTGA	152	XM_010798615.1
			R-AATCCCTGTGGGAGGCACA	152	XM_010798615.1
Crecimiento y metabolismo	Insulin-like growth factor-II receptor	<i>IGF2R</i>	F-GCTGCGGTGTGCCAAGTGAAAAAG	201	NM_174352.2
			R-AGCCCCCTCTGCCGTTGTACCT	201	NM_174352.2
Factores de transcripción	Nuclear respiratory factor 1	<i>NRF1</i>	F-CTGTCGCCCAAGTGAATTATTCG	67	NM_001098002.2
			R-TGTAACGTGGCCAGTTTTGT	67	NM_001098002.2
	Tumor protein 53	<i>TP53</i>	F-GACTCCTCGTGGTAACCTGCT	92	NM_001009403.1
			R-AATTTTCTTCTCAGTGC GGC	92	NM_001009403.1
	Mitochondria polymerase gamma 2 accessory subunit	<i>POLG2</i>	F-CTTCTGGGAAACTACGGGAGAAC	84	NM_001075191.1
			R-GTAGCCTCTTGTTTACCAGATCCA	84	NM_001075191.1
Apoptosis	Integral membrane protein 2B	<i>ITM2B</i>	F-GTCCCAGAGTTTGCAGATAGTGA	104	NM_001035093.1
			R-GGAATCACATAGCACTTATCCAGGTT	104	NM_001035093.1
	BCL2-associated X protein	<i>BAX</i>	F-GTTGTCGCCCTTTTCTACTTTGC	89	NM_173894.1
			R-CAGCCCATGATGGTCCTGATC	89	NM_173894.1
	B-cell CLL/lymphoma 2	<i>BCL2</i>	F-GGAGCTGGTGGTTGACTTTC	518	NM_001077486.2
			R-CTAGGTGGTCATTCAGGTAAG	518	NM_001077486.2
Uniones Gap	Gap junction protein, alpha 1	<i>GJA1</i>	F-TGCCTTTCGTTGTAACACTCA	143	NM_174068.2
			R-AGAACACATGAGCCAAGTACA	143	NM_174068.2
Housekeeping	H2A histone family, member Z	<i>H2AFZ</i>	F-ATTGCTGGTGGTGGTGTCAT	147	NM_001009270.1
			R-ACTGGAATCACCAACTGGA	147	NM_001009270.1

11. Análisis estadístico

Los datos obtenidos (media \pm error estándar de la media (EEM)) fueron analizados con el programa SPSS 24.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). La normalidad de los datos fue verificada por una prueba Kolmogorov-Smirnov. Se realizaron 4 réplicas de cada experimento.

Se llevó a cabo un ANOVA factorial para evaluar el efecto de los diferentes medios (CAP-ESS 1, CAP-ESS 2 y NCAP) utilizados sobre los parámetros espermáticos y la fertilidad, considerando como efectos fijos los diferentes tratamientos (CAP-ESS 1, CAP-ESS 2 y NCAP) y la réplica. Además, para estudiar el efecto de los diferentes sueros utilizados durante la co-incubación sobre el análisis de abundancia relativa de transcrito de ARNm en los blastocistos, el suero utilizado (CAP-ESS 1 y CAP-ESS 2) y la réplica de PCR (3 réplicas técnicas) fueron considerados efectos fijos. Se consideró que existían diferencias significativas para el factor a estudiar cuando $P < 0.05$. Cuando el ANOVA reveló un efecto significativo, los valores fueron comparados por el test de Bonferroni.

Resultados

Parámetros de motilidad de las muestras espermáticas incubadas con diferentes sueros

Los espermatozoides incubados con los diferentes sueros no mostraron diferencias significativas para ningún parámetro de motilidad espermática evaluada (Figura 1). Por otra parte, la VCL y ALH disminuyeron de forma significativa cuando los espermatozoides fueron incubados en presencia de ESS respecto al control negativo (NCAP) (Figura 1 b y d). Sin embargo, no observamos diferencias ($P > 0.05$) para la MT y LIN entre los medios CAP-ESS y el NCAP.

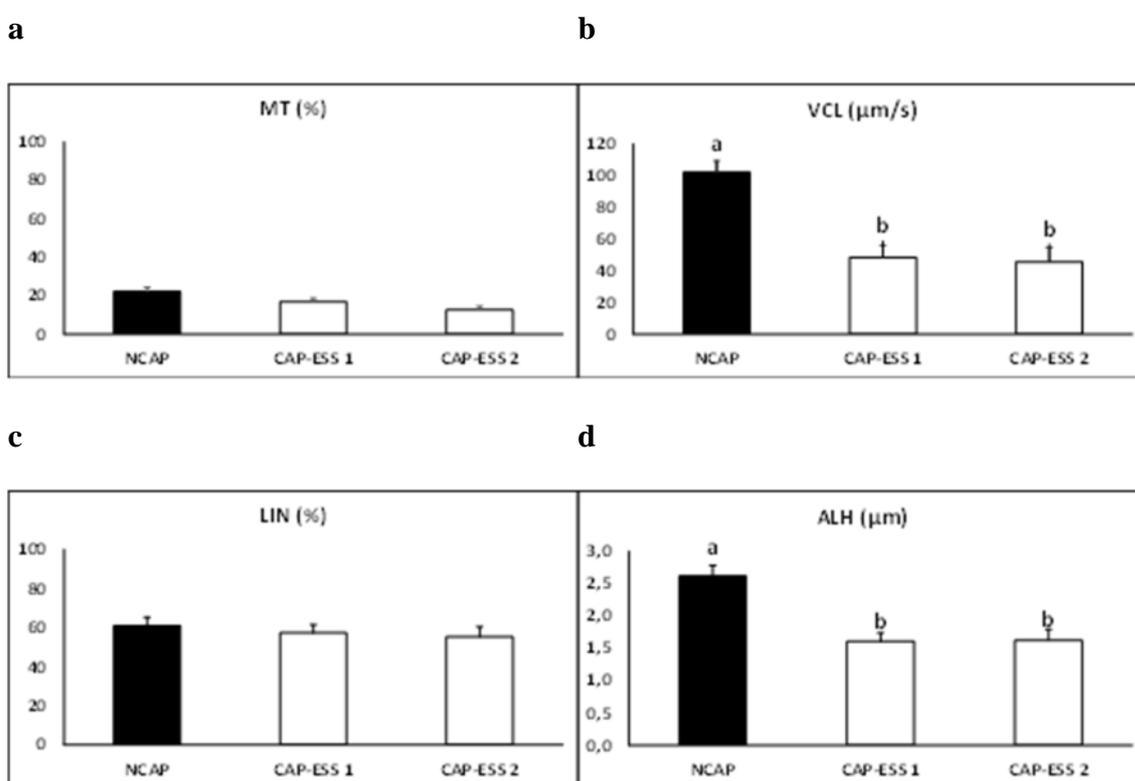


Figura 1. Parámetros de motilidad tras la incubación de espermatozoides de morueco con diferentes sueros CAP-ESS 1, CAP-ESS 2 y NCAP (control negativo). (a) MT (%): motilidad total; (b) VCL ($\mu\text{m s}^{-1}$): velocidad curvilínea; (c) LIN (%): índice de linealidad; (d) ALH (μm): amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide. Valores con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes medios. Las barras representan la media \pm EEM.

Parámetros evaluados mediante citometría de flujo de las muestras espermáticas incubadas con diferentes sueros

Como observamos en la Figura 2, no hubo diferencias ($P > 0.05$) entre los medios CAP-ESS para el porcentaje de espermatozoides viables, el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto, el porcentaje de espermatozoides con mitocondrias activas y la producción de ROS. Sin embargo, todos estos parámetros espermáticos fueron significativamente menores ($P < 0.05$) en aquellas muestras espermáticas incubadas en presencia de ESS respecto al tratamiento control (NCAP) (Figura 2 a-d). Por otra parte, no observamos diferencias para el porcentaje de espermatozoides apoptóticos y los espermatozoides no viables entre los medios CAP-ESS y el NCAP (Figura 2 a).

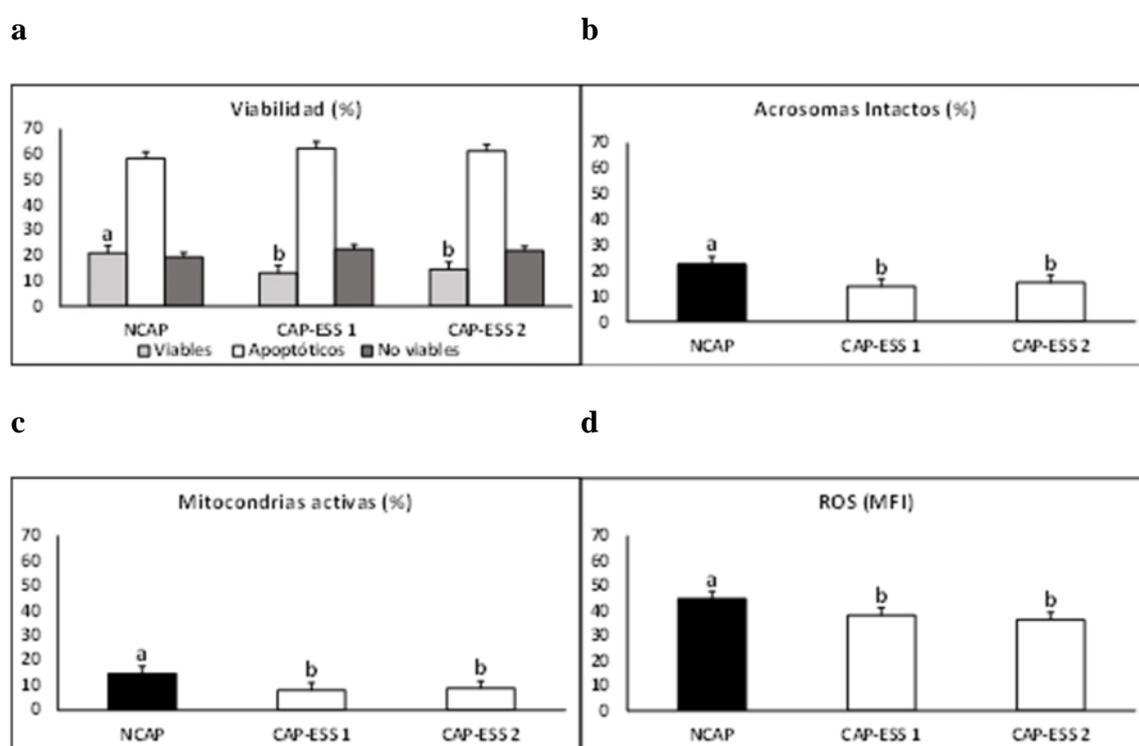


Figura 2. Parámetros evaluados mediante citometría de flujo tras la incubación de espermatozoides de morueco en con diferentes sueros CAP-ESS 1, CAP-ESS 2 y NCAP (control negativo). (a) Porcentaje de espermatozoides viables, apoptóticos y no viables (muertos); (b) Porcentaje de espermatozoides viables con acrosomas intactos; (c) Porcentaje de espermatozoides viables con mitocondrias activas; (d) Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Valores con diferentes letras indican diferencias

significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes medios. Las barras representan la media \pm EEM.

Fosforilación en residuos tirosina de las muestras espermáticas incubadas con diferentes sueros

Las 13 bandas de proteínas que mostraron fosforilación en tirosina fueron agrupadas en regiones de diferente peso molecular (alto: 42-120 kDa; medio: 32-37 kDa; y bajo: 17-28 kDa) (Figura 3 a). Como se observa en la Figura 3, la presencia de suero en el medio aumento la fosforilación en P tyr para las regiones de proteínas comprendidas entre 42-120 kDa y 17-28 kDa en relación al control negativo (NCAP). Además, existieron diferencias significativas entre sueros para la banda que agrupó las proteínas de peso molecular 32-37 kDa y más concretamente para las proteínas de 32 kDa, con una mayor fosforilación en tirosina para el CAP-ESS 1 y siendo además diferente ($P < 0.05$) este tratamiento al NCAP.

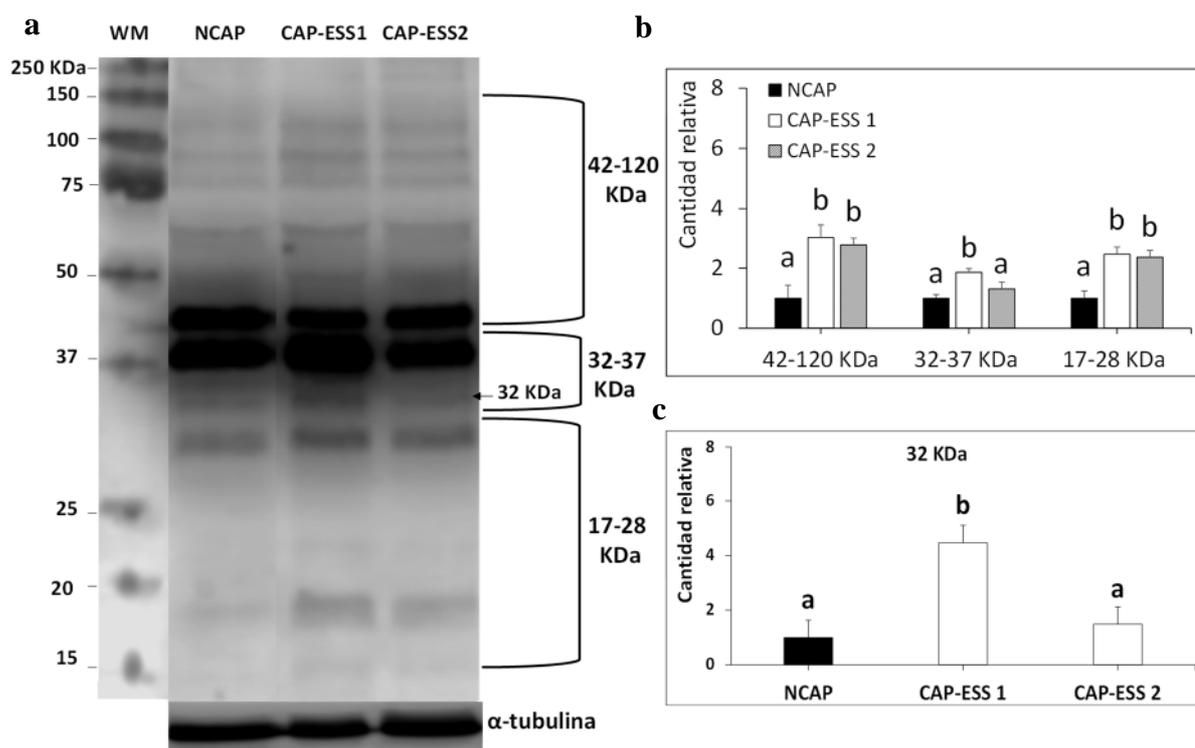


Figura 3. Fosforilación de proteínas en residuos de tirosina tras la incubación de espermatozoides de morueco en el medio CAP-ESS 1, CAP-ESS 2 y NCAP (control negativo). (a) Imagen representativa de una membrana del análisis de Western-Blot mostrando las regiones moleculares bajo estudio y la banda de proteínas de peso molecular correspondiente a 32 KDa. (b) Niveles de fosforilación en tirosina en cada una de las regiones establecidas de proteínas con diferente peso molecular (42-120; 32-37 y 17-28 kDa) normalizada utilizando los valores de NCAP como referencia. (c) Valores de fosforilación en tirosina de la banda de proteínas de peso molecular 32 kDa. Valores con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes medios. Las barras representan la media \pm EEM de los valores normalizados al control negativo.

Test de fecundación in vitro utilizando diferentes sueros durante la capacitación espermática y la co-incubación de espermatozoides y ovocitos

Cuando el ESS no estuvo presente en el medio de capacitación y en el de fecundación apenas se obtuvieron embriones (Tabla 2). Además, no observamos diferencias ($P > 0.05$) en las tasas de división a las 48 h.p.i ni tampoco en el porcentaje de blastocistos obtenidos

mediante el uso de los distintos ESSs en los medios de capacitación y fecundación (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la presencia de diferentes sueros en el medio de capacitación y fecundación sobre las tasas de división a las 48 h.p.i. y producción de embriones desarrollados hasta la etapa de blastocisto en la especie ovina. NCAP: control negativo.

Medio de capacitación	NCAP	CAP-ESS 1	CAP-ESS 2
Tasa de división 48 h.p.i (%)	1.78±9.81 ^a	44.83±8.16 ^b	55.93±8.16 ^b
Blastocistos (%)	0.66±6.32 ^a	26.81±6.32 ^b	26.80±6.32 ^b

Diferentes superíndices indican diferencias significativas (P < 0.05) entre las medias.

Abundancia de ARNm de los blastocistos

Tras evaluar los niveles de expresión de trece genes en los blastocistos obtenidos con los medios CAP-ESS 1 y CAP-ESS 2, no observamos diferencias ($P > 0.05$) entre sueros para ninguno de los genes estudiados (Figura 4). La producción de embriones no fue posible mediante el uso del medio NCAP, por lo que este medio no fue incluido en el análisis de abundancia de ARNm

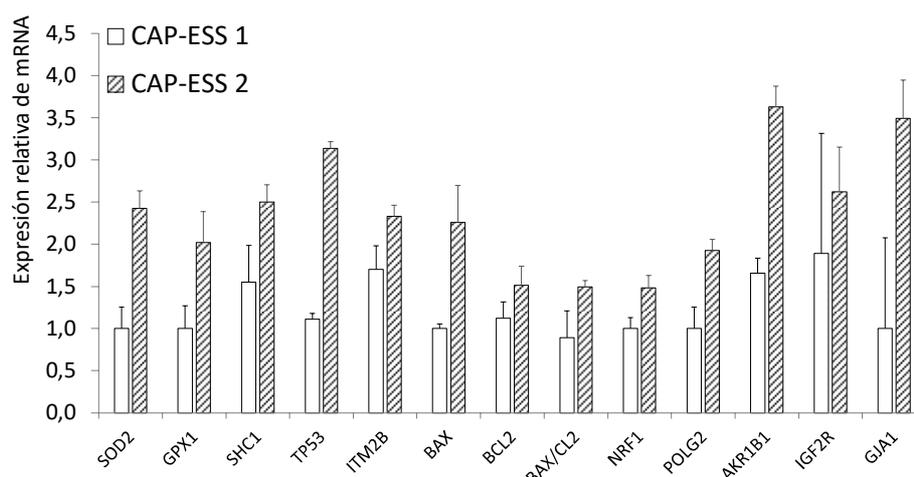


Figura 4. Transcripción relativa de ARNm de los blastocistos con espermatozoides y ovocitos co-incubados con los diferentes sueros.

Discusión.

En nuestro estudio, observamos que el comportamiento de los espermatozoides descongelados de ovino fue diferente cuando se incubó en condiciones de capacitación (CAP-ESS) comparado con el control negativo (NCAP). Así, independientemente del ESS utilizado, los espermatozoides mostraron una menor motilidad, viabilidad, integridad del acrosoma, actividad mitocondrial y producción de ROS respecto a las muestras espermáticas incubadas en medio NCAP. La disminución de la calidad de los espermatozoides de ovino descongelados e incubados en condiciones de capacitación coincide con la reportada en ovino por otros autores [52]. Así, los cambios a nivel estructural y funcional que experimenta el espermatozoide tras la criopreservación junto con los desarrollados en condiciones de capacitación favorecen el deterioro y muerte celular si la fecundación no se produce en un corto período de tiempo [45]. Por otra parte, la menor producción de ROS observada en las muestras espermáticas incubadas con ESS respecto al medio NCAP coincide con lo reportado previamente en ovino [110] respecto a la capacidad antioxidante del ESS. Además, asegurar unos niveles adecuados de ROS es imprescindible para el desarrollo normal de la capacitación [52], y el ESS parece neutralizar el exceso de ROS en este contexto. Sin embargo, cuando comparamos ambos ESSs, estos parámetros espermáticos no mostraron diferencias, excepto para la fosforilación de los residuos de tirosina de las proteínas que sí fue significativamente diferente para los espermatozoides de morueco incubados con cada uno de los ESSs.

La fosforilación de los residuos de tirosina es considerada un evento clave para la capacitación [35], y ha sido descrito en espermatozoides capacitados de ovino [116]. Nuestros resultados muestran, por primera vez, la diferente capacidad que tienen ESS

procedentes de distintas hembras para modular la fosforilación en tirosina en espermatozoides de morueco. Así, sólo el ESS 1 utilizado en el medio de capacitación (CAP-ESS 1) fue capaz de incrementar la fosforilación en tirosina de proteínas con pesos moleculares comprendidos entre 32-120 kDa. El incremento de la fosforilación en tirosina en proteínas de similar peso molecular ha sido asociado a la CIV de espermatozoides de morueco en estudios previos [116,117]. Sin embargo, en nuestro trabajo, observamos que las proteínas de peso molecular medio (32-37 kDa) no se vieron modificadas cuando los espermatozoides fueron incubados en el medio CAP-ESS 2. Estos resultados evidencian que diferentes ESSs, a pesar de haber sido obtenidos en las mismas condiciones, tienen un efecto variable sobre la fosforilación en tirosina asociada a la capacitación espermática. Además, otros autores [116,117] han relacionado la adquisición del estado capacitado de los espermatozoides de morueco con un incremento de la fosforilación en tirosina de la banda de proteínas de peso molecular alrededor de 30 kDa. Coincidiendo con este trabajo, nuestros resultados mostraron que sólo los espermatozoides incubados con el medio CAP-ESS 1 mostraron un aumento en la fosforilación en tirosina de estas proteínas (32 kDa). Sin embargo, el medio CAP-ESS 2 fue incapaz de inducir este aumento y los espermatozoides incubados en presencia del ESS 2 mostraron valores de fosforilación en tirosina en estas proteínas similares a los registrados con el medio NCAP. Aunque en pequeños rumiantes no se han identificado las proteínas de 32 kDa que experimentan esta modificación durante la CIV, en otras especies como bovino, porcino y humano, ha sido posible la identificación de la proteína p32, a la cual se le han atribuido funciones importantes relacionadas con la unión del espermatozoide a la zona pelúcida del ovocito [118–122].

A pesar de que en nuestro estudio ambos ESS fueron obtenidos en las mismas condiciones tras administrar un tratamiento idéntico de inducción al celo a las hembras, la variabilidad propia de cada individuo o una diferente respuesta al tratamiento podría estar influyendo en la composición del ESS, lo que podría justificar su efecto diferencial sobre la fosforilación de tirosina durante la capacitación espermática. En otras especies de pequeños rumiantes como el ciervo, se ha observado que, mientras que el ESS estimula el incremento de la fosforilación de tirosina asociado a la capacitación, el suero de cierva en celo (EDS) es incapaz de promoverlo [50]. También se ha demostrado como la capacitación de espermatozoides de cerdo con sueros obtenidos de hembras en celo tratadas o no con ACTH, generó diferentes patrones de fosforilación de tirosina [102].

Las diferencias en la fosforilación en los residuos de tirosina detectadas entre sueros en nuestro trabajo, no se reflejaron en las tasas de ovocitos divididos y de blastocistos obtenidas, donde no observamos un efecto significativo por el uso de distintos EES. Por otra parte, nuestros resultados corroboran que, en ovino, la presencia de ESS es imprescindible para que ocurra la fecundación ya que apenas se obtuvieron embriones cuando el medio NCAP fue utilizado para la capacitación y FIV. Aunque no hay trabajos en pequeños rumiantes que evalúen la producción embrionaria tras el uso de distintos ESS durante la FIV, en otras especies como el porcino [102] se ha demostrado que el uso de distintos sueros durante esta fase generó una producción variable de embriones. Además de las diferencias entre especies (ovino y porcino), los diferentes resultados entre trabajos también pudieron ser debidos a que, si bien nuestros ESSs se obtuvieron tras el mismo tratamiento de inducción al celo, los sueros empleados por en el trabajo llevado a cabo en porcino procedían de cerdas con perfiles hormonales distintos[102].

Por último, cuando analizamos el efecto de distintos ESS en el medio de capacitación y fecundación sobre la expresión de un grupo de genes en los blastocistos producidos, no observamos ninguna diferencia significativa entre ambos sueros. Diferentes estudios realizados en bovino observaron que la presencia o ausencia de suero en los medios de cultivo embrionario afectó a los patrones de expresión génica de blastocistos [105,106]. Mientras que en estos trabajos el suero estuvo en contacto con los embriones durante 7-8 d.p.i., en nuestro estudio los diferentes ESS estuvieron sólo 18 h en contacto con los gametos y presuntos cigotos, pudiendo ser la razón por la que no observamos diferencias entre ESSs en los niveles de los transcritos de los genes analizados en los blastocistos. Sin embargo, considerando el bajo número de embriones analizados en nuestro estudio y las diferencias observadas entre los ESSs para la fosforilación en tirosina de los espermatozoides durante la capacitación, no podemos descartar un posible efecto de los distintos ESSs sobre la calidad de los embriones producidos. Además, la tendencia que observamos en los mayores niveles de expresión de los genes analizados, relacionados con estrés oxidativo (*SOD 2*), factores de transcripción (*TP 53*), procesos apoptóticos (*BAX*), implantación y metabolismo (*AKR1B1*) y uniones GAP (*GJA1*) cuando el ESS 2 estuvo presente en el medio de capacitación y fecundación podrían estar indicando un efecto variable de cada ESS también sobre la calidad de los blastocistos obtenidos. Sin embargo, nuestros resultados no nos permiten confirmar esta hipótesis la cual debe ser estudiada en profundidad ampliando tanto el número de embriones como el análisis de estos y evaluando también parámetros de calidad de los presuntos cigotos, inmediatamente después de la co-incubación bajo la influencia de ESS procedentes de distintas hembras.

En conclusión, los resultados de este estudio muestran, por primera vez, que el uso de distintos ESSs en el medio de capacitación durante la FIV en la especie ovina tuvo un efecto variable sobre el desarrollo de la fosforilación en los residuos de tirosina asociada al proceso de capacitación. Más estudios son necesarios para entender el significado de esta variabilidad tras el uso de ESS como agente capacitante.

CAPÍTULO II

**Caracterización de los cambios moleculares, estructurales y
funcionales de los espermatozoides descongelados de ciervo
Ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*) durante la capacitación *in
vitro***

Resumen

El objetivo de este trabajo fue estudiar y caracterizar, por primera vez, el comportamiento de los espermatozoides descongelados de ciervo Ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*) durante la incubación en condiciones de CIV. Para ello, muestras espermáticas de tres ciervos adultos fueron descongeladas y procesadas conjuntamente. Posteriormente, fueron diluidas en un fluido sintético oviductal suplementado con 20% de ESS (medio CAP) e incubadas en 5 % CO₂ a 38.5 °C durante 24 h. Parámetros espermáticos relacionados con la motilidad (SCA[®]), integridad de la membrana acrosomal, integridad y del desorden de fosfolípidos de la MP, actividad mitocondrial, producción de especies reactivas de oxígeno y estado de la cromatina (mediante citometría de flujo), así como la fosforilación de los residuos de tirosina (mediante Western-Blot y microscopía de fluorescencia) fueron evaluados a diferentes tiempos de incubación (1, 5, 15, 30, 45, 60, 120 min y 24 h). Se evaluaron también, como control negativo, espermatozoides incubados con un medio sin suero (NCAP) inmediatamente después de la dilución (0 min) y tras 120 min en 5% CO₂ a 38.5 °C. Tras seleccionar aquellos tiempos de incubación donde los espermatozoides experimentaron cambios compatibles con aquellos descritos durante la capacitación espermática, (aumento del desorden de fosfolípidos de la MP y fosforilación de los residuos de tirosina) se llevó a cabo un test de FIV heteróloga incubando los espermatozoides en un medio CAP durante 5, 15, 30 y 60 min con el objetivo de evaluar la capacidad fecundante de las muestras espermáticas. Nuestros resultados mostraron que la MT, la VCL y la ALH disminuyeron tras 30-45 min de incubación en un medio CAP en relación al tiempo inicial, no modificándose la mayor parte de los parámetros durante la incubación en un medio NCAP. El porcentaje de espermatozoides vivos y con mitocondria activa disminuyó después de 45 minutos de incubación para CAP, aunque el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto disminuyó de forma significativa con tan solo 15 min de incubación. Los parámetros indicativos de capacitación, el aumento de fosforilación de los residuos de tirosina

y del desorden de fosfolípidos de la MP, se incrementaron en el medio CAP desde el primer minuto de incubación, disminuyendo a partir de los 45 min el porcentaje de espermatozoides fosforilados y manteniéndose constante a lo largo de todo el periodo de incubación el porcentaje de espermatozoides con mayor desorden de fosfolípidos de la MP. Los cambios en la fosforilación de los residuos de tirosina a lo largo del periodo de incubación se reflejaron en los diferentes patrones observados en las distintas estructuras de los espermatozoides, disminuyendo el porcentaje de espermatozoides con patrón I (no fluorescencia) a partir de los primeros 5 min de incubación e incrementándose los patrones II (fluorescencia en región ecuatorial), III (fluorescencia en el acrosoma) y IV (fluorescencia en región ecuatorial y acrosoma) a los 30, 45 y 5 min respectivamente. Además, la incubación de los espermatozoides descongelados durante 60 min en un medio CAP resultó en un menor porcentaje de embriones divididos en relación a los tiempos más cortos (5, 15 y 30 min y el tratamiento NCAP). Finalmente, observamos una correlación positiva entre la fosforilación en los residuos de tirosina, la proporción de espermatozoides que muestran la fosforilación sólo en la región ecuatorial y acrosomal y el %HDS con la tasa de división a las 48 h.p.i., respectivamente, confirmando la importancia de estos parámetros durante la capacitación para incrementar la capacidad fecundante de los espermatozoides de ciervo. Los resultados obtenidos contribuyen de forma significativa al desarrollo y optimización de TRAs, en concreto la FIV, en esta subespecie de ciervo garantizando el éxito de su aplicación con fines tanto de conservación de especies como para lograr un progreso genético más rápido.

Introducción

El desarrollo de las biotecnologías reproductivas en especies de rumiantes silvestres, como el ciervo rojo (*Cervus elaphus*), no ha experimentado los mismos avances observados en otros rumiantes domésticos como la especie bovina [123]. Entre las diferentes TRA que actualmente se aplican, la técnica de FIV tiene un gran potencial en el sector ganadero permitiendo acelerar el progreso genético además de ser una herramienta imprescindible para la conservación de especies [4,6,124]. La FIV comprende diferentes etapas que incluyen la maduración del ovocito, la fecundación y el cultivo embrionario [125]. Cada una de éstas, representa un punto crítico para la producción *in vitro* de embriones con la suficiente calidad para poder ser transferidos posteriormente con éxito.

Para que los espermatozoides puedan llevar a cabo el proceso de fecundación, es necesario que desarrollen una serie de eventos fisiológicos y moleculares que se agrupan en un proceso conocido con el nombre de capacitación espermática [38,94]. Este proceso, está asociado con cambios en el patrón de movimiento de los espermatozoides, los cuales adquieren un movimiento de hiperactivación, y culmina con la pérdida del acrosoma [39]. La capacitación espermática ocurre de manera natural en el tracto reproductor de la hembra, sin embargo, puede inducirse y desarrollarse *in vitro* utilizando medios y condiciones que imitan lo que sucede de manera fisiológica [126]. Aunque los procesos que ocurren durante la capacitación (modificación de los lípidos de la MP y pérdida de colesterol, aumento de las concentraciones de Ca^{2+} y del pH intracelular, activación de la vía de señalización del AMPc, aumento de la actividad de la proteína Kinasa A (PKA), aumento de la fosforilación en los residuos de tirosina [48] son comunes a todas las especies de mamíferos, las condiciones en las que se llevan a cabo son específicas de cada especie [36,127–130]. Por lo tanto, es imprescindible realizar estudios enfocados en caracterizar e identificar las condiciones idóneas en cada especie, y en cada tipo

de muestra espermática, con el objetivo de definir y optimizar protocolos de CIV que permitan reproducir con garantías lo que ocurre *in vivo*.

La CIV se ha logrado con éxito en diferentes especies incubando los espermatozoides en medios cuya composición está basada en la del fluido oviductal [116,131,132]. Sin embargo, la eficiencia de este proceso depende del agente capacitante utilizado que es específico de cada especie, siendo el ESS la sustancia para inducir la CIV en pequeños rumiantes, entre ellos el ciervo [75,76,92,99,133–136].

Por otra parte, debemos considerar que, en especies silvestres como el ciervo, es común el uso de semen congelado cuando se aplican TRA [2]. Se ha demostrado que la congelación espermática afecta al desarrollo normal de la capacitación [52,67]. Así, diferentes autores han reportado, en pequeños rumiantes, que el semen fresco requiere de períodos de incubación más largos en condiciones de capacitación comparado con el semen descongelado para manifestar aquellos cambios indicadores de este proceso [52,71]. Además, la criopreservación induce daños en una considerable proporción de espermatozoides modificando la composición y la permeabilidad de la MP, reduciendo la viabilidad, la motilidad y la actividad mitocondrial, y aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) [52,70,137]. Así, es de especial interés llevar a cabo estudios en el tiempo monitorizando diferentes características espermáticas que nos permitan conocer la dinámica de la capacitación en espermatozoides descongelados para poder utilizarlos en el momento óptimo sin que su viabilidad y funcionalidad se vean comprometidas.

Por todo lo citado anteriormente, el objetivo de nuestro estudio fue explorar y monitorizar los cambios que se producen a lo largo del tiempo de incubación en condiciones de capacitación en espermatozoides descongelados de ciervo Ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*) y evaluar cómo afectan dichos cambios al proceso de FIV.

Materiales y métodos.

1. Reactivos

Salvo que se indique lo contrario todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Madrid, España). Los fluorocromos fueron obtenidos de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, USA) y el aceite mineral de NidOil™ (Nidacon International, Suecia).

2. Recogida y criopreservación espermática

Las muestras espermáticas procedieron del Banco de Germoplasma de la Universidad de Castilla-La Mancha (UCLM) (ES07RS02OC) siguiendo el RD 841/2011. Se utilizaron dosis de 3 machos adultos (> 2 años de edad) de ciervo Ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*). Los eyaculados fueron obtenidos durante la época reproductiva (mediados del mes de septiembre) mediante electroeyaculación como describió Martínez-Pastor et al. [138]. Los ciervos fueron inmovilizados y anestesiados con una inyección intravenosa de xilacina (0.75 mg kg⁻¹; Rompun®; Bayer AG, Leverkusen, Alemania) y ketamina (1.5 mg kg⁻¹; Imalgene 1000®; Rhone-Mérieux, Lyon, Francia). Las heces fueron retiradas del recto y la zona del prepucio fue lavada con solución salina fisiológica (ver Anexo I). La electroeyaculación fue llevada a cabo utilizando una sonda con una longitud de 375 mm y una anchura de 40 mm; la longitud de los electrodos fue de 80 mm. La sonda estuvo conectada a una fuente que permitió controlar tanto el voltaje como el amperaje. La eyaculación de los animales ocurrió a unos valores medios de 4.5 V y 90 mA (el tiempo medio registrado hasta la eyaculación fue de 3 min). La anestesia fue revertida con clorhidrato de yohimbina (0.3 mg kg⁻¹; preparado al 0.9 %; Sigma, Madrid, España).

El eyaculado fue recogido en fracciones en tubos graduados atemperados. La presencia de orina fue analizada en cada fracción de eyaculado recogido mediante tiras reactivas de urea (Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Alemania), siendo descartadas las fracciones contaminadas. El resto de las fracciones del eyaculado que presentaban una motilidad similar

fueron mezcladas y mantenidas en un baño térmico con solución salina fisiológica a 30 °C hasta su congelación que se realizó siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

El semen fue diluido hasta una concentración final de 200×10^6 espermatozoides mL^{-1} en un diluyente Triladyl® (Minitüb, Tiefenbach, Alemania) suplementado con 20 % (v/v) de yema de huevo. Las muestras diluidas fueron enfriadas lentamente (desde 37 °C a 5 °C) durante 90 min y mantenidas a 5 °C durante 2 h. Tras este período, las muestras fueron envasadas en pajuelas de 0.25 mL (Minitüb, Tiefenbach, Alemania) y congeladas en vapores de nitrógeno (a una altura de 4 cm sobre el nivel de nitrógeno líquido) durante 10 min como describió Soler et al. [139]. Posteriormente, las pajuelas fueron sumergidas en nitrógeno líquido, donde permanecieron almacenadas hasta su utilización.

3. *Diseño experimental*

Para eliminar diferencias individuales, se descongelaron y procesaron conjuntamente muestras espermáticas de tres ciervos adultos. La descongelación de las pajuelas se realizó mediante inmersión en un baño térmico con solución salina fisiológica a 37 °C durante 30 s. A continuación, se realizó una centrifugación en un gradiente de diferente densidad de Percoll® (45%/90%) a 700 g durante 10 min con el objetivo de eliminar el plasma seminal, el diluyente de congelación y aumentar la proporción de espermatozoides viables [140]. Tras la centrifugación, el sobrenadante fue retirado y una parte del pellet obtenido fue diluido hasta una concentración de 10×10^6 espermatozoides mL^{-1} en un SOF [141] ligeramente modificado (mSOF; ver Anexo I) suplementado con un 20 % de ESS (v/v) (medio CAP) para capacitar a los espermatozoides de ciervo [76,92,131,133,142,143]. La otra parte del pellet fue diluida hasta la misma concentración espermática en un mSOF suplementado con 0.1 % (v/v) de alcohol de polivinilo (PVA) (medio NCAP).

Todas las muestras espermáticas fueron incubadas en un 5 % de CO_2 a 38.5 °C evaluando diferentes parámetros a los 1, 5, 15, 30, 45, 60, 120 min y 24 h para las muestras

incubadas con el medio CAP; y tras la dilución (0 min) y a los 120 min, en las muestras incubadas en el medio NCAP (control negativo).

Tras el análisis de los parámetros espermáticos evaluados a cada tiempo de incubación en ambos tipos de muestras, se realizó un test de FIV heteróloga seleccionando sólo aquellos tiempos de incubación en un medio CAP (5, 15, 30 y 60 min) donde los espermatozoides experimentaron cambios compatibles con aquellos experimentados durante la capacitación espermática (aumento de la Fosforilación en tirosina y de del desorden de fosfolípidos de la MP). Como control negativo, se utilizaron muestras espermáticas diluidas en medio NCAP sin incubación (0 min).

4. *Evaluación de parámetros de motilidad espermática objetiva*

La motilidad objetiva de los espermatozoides, incubados en ambos medios (CAP y NCAP) durante diferentes períodos de tiempo, fue evaluada mediante el software Sperm Class Analyzer (SCA[®], Microptic 2002) como describió Anel-López et al. [144]. Se capturaron, al menos, 10 campos por muestra espermática utilizando una cámara Basler A302 fs digital (Basler Vision Technologies, Ahrensburg, Alemania) acoplada a un ordenador mediante un conector IEEE 1394. El tamaño de las imágenes fue de 768 x 576 píxeles. La velocidad de adquisición fue de 50 imágenes s⁻¹ y el tamaño de la cabeza de los espermatozoides se limitó a un área comprendida entre 20-90 μm². Para cada muestra, se registraron los siguientes parámetros: motilidad total (MT, %), definida como porcentaje de espermatozoides con una velocidad > 10 μm s⁻¹ según la trayectoria curvilínea; velocidad según la trayectoria curvilínea (VCL, μm s⁻¹); índice de linealidad (LIN, %); y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza de los espermatozoides (ALH; μm).

5. *Análisis de parámetros espermáticos mediante citometría de flujo*

Debido a los cortos períodos de incubación que fueron establecidos en nuestro estudio (0, 1, 5, 15, 30, 45 y 60 min) y el gran número de parámetros evaluados en cada uno de los tiempos, se

utilizaron dos citómetros de flujo simultáneamente para evitar que los diferentes análisis espermáticos se solaparan.

La viabilidad espermática y la integridad del acrosoma fueron evaluadas mediante un citómetro Cell Lab Quanta SC (Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.) junto con el software Cell Lab Quanta SC Analysis. Mientras que el desorden de los fosfolípidos de la MP, la actividad mitocondrial, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la integridad de la cromatina fueron evaluadas mediante un citómetro FC500 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) equipado con el software MXP (v.3). Los datos obtenidos de ambos citómetros fueron analizados con el software WEASEL (WEHI, Melbourne, Australia). En todos los análisis se analizaron 10 000 eventos por muestra espermática, excepto en el análisis de la integridad de la cromatina espermática que se analizaron 5 000 eventos. Todos los fluorocromos fueron excitados con un láser de 488 nm, mientras que el fluorocromo Mitotracker Deep Red fue excitado con un láser helio-neón de 633 nm. En el citómetro FC 500, la fluorescencia verde emitida por el naranja de acridina y los fluorocromos YO-PRO[®]-1 y CM-H₂DCFDA fue detectada por el fotodetector FL-1 (filtro 530/28B); la fluorescencia naranja emitida por la Merocianina 540 por el fotodetector FL-2 (filtro 575/26BP); la fluorescencia roja emitida por el naranja de acridina y el IP por el fotodetector FL-3 (620/40BP); y la fluorescencia emitida por el Mitotracker Deep Red por el fotodetector FL-4 (675/40BP). En el citómetro Cell Lab Quanta SC, la fluorescencia verde emitida por los fluorocromos YO-PRO[®]-1 y FITC fue detectada por el fotodetector FL-1 (filtro 510-540/BP) y la fluorescencia roja emitida por el IP por el fotodetector FL-3 (filtro 670/LP).

Para eliminar cualquier otro tipo de células diferente de la población principal de espermatozoides, se utilizó, en el citómetro FC500, un gráfico de puntos de la dispersión de la luz frontal vs. lateral y, en el citómetro Cell Lab Quanta SC, un gráfico de puntos de la dispersión de la luz lateral vs. el volumen electrónico de las células.

Las muestras espermáticas fueron diluidas hasta una concentración de 1×10^6 espermatozoides mL^{-1} en las diferentes soluciones de tinción (descritas a continuación) preparadas en un medio SOF (ver Anexo I) suplementado con 0.1 % (p/v) de PVA y HEPES (2.35 mg mL^{-1}). Para el análisis de la integridad de la cromatina el protocolo fue diferente y se detalla más adelante.

Para la evaluación de la viabilidad espermática se utilizó la combinación de los fluorocromos yoduro de propidio (IP; $12 \text{ }\mu\text{M}$ (stock: 7.5 mM en agua desionizada)) y YO-PRO[®]-1 (50 nM (stock: 1 mM en DMSO)). La población de espermatozoides IP-/YO-PRO-1- fue considerada como espermatozoides viables; la población IP-/YO-PRO-1+ como espermatozoides apoptóticos; y la población IP+/YO-PRO-1+ fue considerada como espermatozoides no viables (muertos).

La integridad del acrosoma se evaluó mediante la combinación de los fluorocromos PNA-FITC ($3 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ (stock: $100 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de agua desionizada) e IP ($12 \text{ }\mu\text{M}$ (stock: 7.5 mM en agua desionizada)). La población de espermatozoides PNA-FITC-/IP- fue considerada como espermatozoides viables con acrosomas intactos.

La actividad mitocondrial fue analizada con el fluorocromo MitoTracker[®] Deep Red ($0.1 \text{ }\mu\text{M}$ (stock: 1 mM en DMSO)) en combinación con YO-PRO[®]-1 (50 nM (stock: 1 mM en DMSO)). La población de espermatozoides MitoTracker+ / YO-PRO-1- fue considerada como espermatozoides viables con mitocondrias activas.

La evaluación del desorden de fosfolípidos de la MP fue analizada mediante la combinación de los fluorocromos Merocianina 540 (1 mM (stock: 3.4 mM en DMSO)) y YO-PRO[®]-1 (50 nM (stock: 1 mM en DMSO)). La población de espermatozoides Merocianina 540+ fue considerada como espermatozoides con una mayor desorden de fosfolípidos de la MP y fue calculada dentro de la población de espermatozoides viables (YO-PRO-1-).

La producción de ROS fue evaluada con el fluorocromo CM-H₂DCFDA (5 μ M (stock: 2 mM en DMSO)) en combinación con IP (12 μ M (stock: 7.5 mM en agua desionizada)). La población principal de espermatozoides viables (IP-) incubados en medio NCAP al inicio de la incubación (0 min) fue establecida por debajo de la primera década en la escala logarítmica del fotodetector FL-1 (filtro 530/28BP) como valor de referencia en el histograma. A partir de esta configuración, los niveles de ROS fueron representados como el valor medio de la fluorescencia de CM-H₂DCFDA de la población de espermatozoides IP- en cada muestra espermática.

Por último, la integridad de la cromatina espermática se evaluó mediante el test SCSA[®] (*Sperm Chromatin Structure Assay*) descrito por Evenson y Jost (2000). Esta prueba está basada en la susceptibilidad del ADN espermático a la desnaturalización inducida por una solución ácido-detergente utilizando las propiedades metacromáticas de la naranja de acridina. Este fluorocromo emite fluorescencia verde cuando se une al ADN intacto (ADN de cadena doble) mientras que emite fluorescencia roja cuando se une al ADN desnaturalizado (ADN de una sola cadena). Las muestras espermáticas fueron diluidas hasta una concentración de 2×10^6 espermatozoides mL⁻¹ en el medio TNE (Ver Anexo I) y mezcladas con 400 μ L de solución ácido-detergente (ver Anexo I) durante 30 s. A continuación, fue mezclado con naranja de acridina (2.23 M) a una concentración de 2.81 mM evaluando las muestras en el citómetro de flujo tras un período de 2 min de incubación.

El índice de fragmentación del ADN (DFI) de cada espermatozoide se obtuvo a partir de la proporción de fluorescencia roja con relación a la fluorescencia total (verde + roja). Además, se calculó la inmadurez o grado de descondensación de la cromatina (HDS) que representa la intensidad de la fluorescencia verde por encima del canal 600 de cada espermatozoide [146]. Los datos obtenidos del citómetro fueron analizados utilizando el software R obteniendo el porcentaje de espermatozoides con un DFI > 0.25 (%DFI) y el porcentaje de espermatozoides con fluorescencia verde por encima del canal 600 (%HDS) de cada muestra.

6. Análisis de la fosforilación de los residuos de tirosina

La fosforilación de los residuos de tirosina fue analizada en las muestras espermáticas, diluidas en ambos medios (CAP y NCAP) e incubadas durante diferentes períodos de tiempo, mediante Western-Blot. Para ello, las proteínas fueron extraídas como había sido descrito por [111]. Tras añadir b-mercaptoetanol al 5 %, las muestras espermáticas se llevaron a ebullición durante 3 min. Los extractos de proteínas procedentes de 5×10^6 de espermatozoides se cargaron en geles de poliacrilamida y se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE. Las proteínas se sometieron a electro-transferencia en membranas de PVDF (Bio-Rad) a 250 mA durante 120 min a 5 °C. Los sitios no específicos de las membranas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente en un tampón TBS (ver Anexo I) con Tween[®] 20 al 0.1 % (v/v; T-TBS) suplementado con gelatina al 20 % (v/v) antes de llevar a cabo la incubación con el anticuerpo primario. Tras el bloqueo, las membranas fueron incubadas durante 1h a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (1:1 000, Clon 4G10[®]; Millipore) en T-TBS. A continuación, fueron incubadas con el anticuerpo secundario (1:10 000, Anti-mouse, HRP-linked antibody; Sigma Aldrich) en T-TBS en las mismas condiciones descritas anteriormente. Para descartar la influencia de las posibles diferencias en la cantidad de proteínas extraídas, las membranas se reutilizaron (stripping) para su posterior incubación con el anticuerpo anti-tubulina. Para ello, con la intención de eliminar completamente las uniones de las proteínas adheridas a la membrana con el anticuerpo primario (anti-fosfotirosina) y secundario, la membrana se mantuvo durante 15 min en una solución (pH 6.5) compuesta de SDS al 2 % (p/v), 0.74 % (v/v) de b-mercaptoetanol, 62.5 mM Tris a 65 °C y en agitación. A continuación, las membranas fueron lavadas seis veces durante 5 min en T-TBS. Posteriormente, se realizó un bloqueo de los sitios no específicos de la membrana con leche al 5 % (p/v) en tampón T-TBS y las membranas fueron incubadas con el anticuerpo anti-tubulina (1:1 000, Clon B-5-1-2; Sigma Aldrich) en T-TBS con leche al 2 % (p/v) durante 2 h a temperatura ambiente y con el

anticuerpo secundario (1:10 000, Anti-mouse, HRP-linked antibody; Sigma Aldrich) en T-TBS en las mismas condiciones.. Las membranas fueron reveladas mediante el C-DiGit Chemiluminescent Western Blot Scanner (LI-COR) y el posterior análisis de las imágenes digitalizadas utilizando el software Image Studio Lite V5 de Licor. Para comparar los resultados obtenidos en cada tiempo de incubación, las bandas de proteínas correspondientes a la Fosforilación en tirosina se relativizaron a la señal de la tubulina, se cuantificaron y normalizaron considerando el control negativo (NCAP) a los 0 min como valor unitario.

Además, para identificar las regiones del espermatozoide que mostraban fosforilación en residuos de tirosina y su evolución a lo largo de la incubación en condiciones de capacitación, se llevó a cabo un análisis de inmunodetección indirecta evaluándose mediante microscopia de fluorescencia. Para ello, se utilizó el protocolo descrito por Kumaresan et al. [147], con ligeras modificaciones. Los espermatozoides fueron fijados en un portaobjeto realizando un frotis y se permeabilizaron con etanol al 70 % durante 30 min. Los sitios no específicos se bloquearon con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Sigma Aldrich) suplementada con BSA al 10 % (p/v) (PBS-BSA). Posteriormente, los espermatozoides fueron incubados con el anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (1:300, Clon 4G10[®]; Millipore) en PBS-BSA durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, las muestras fueron lavadas durante 5 min en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario (1:500, Anti-Mouse IgG-FITC; Sigma Aldrich) en PBS-BSA durante 1 h en oscuridad a temperatura ambiente. Todas las incubaciones se realizaron en agitación.

Por último, las muestras fueron lavadas con PBS y secadas al aire. Para el montaje de las muestras se utilizó el medio DPX Mountant. Todas las muestras fueron analizadas con un objetivo 60 X mediante microscopia de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i) con el Módulo Nikon Intensilight C-HGFI, utilizando un filtro EX 450-490 nm (DM 505; BA 520). Se observaron cuatro tipos de patrones en función de la región del espermatozoide que mostraba fluorescencia:

(I) ausencia de fluorescencia (patrón I); (II) fluorescencia triangular en el segmento ecuatorial (patrón II); (III) fluorescencia en la región acrosómica (patrón III); (IV); fluorescencia tanto en la región acrosómica como en el segmento ecuatorial (patrón IV) (Figura 9). Se analizaron un mínimo de 100 espermatozoides por muestra, registrando los porcentajes de espermatozoides con y sin fosforilación en residuos de tirosina, así como las poblaciones de espermatozoides correspondientes a los diferentes patrones de fosforilación anteriormente descritos. Como controles negativos, las muestras se incubaron con IgG1-FITC (1:500, clon MOPC; Sigma Aldrich) en lugar del anticuerpo primario, no registrando fluorescencia en ninguno de los espermatozoides evaluados.

7. *Test de fecundación in vitro heteróloga*

Tras seleccionar aquellos tiempos de incubación donde los espermatozoides de ciervo experimentaron cambios compatibles con la capacitación espermática (5, 15, 30 y 60 min), se llevó a cabo un test de FIV heteróloga utilizando ovocitos de oveja. Este tipo de prueba ha sido utilizado en ciervos para evaluar la calidad espermática como alternativa a una FIV homóloga [19]. Para ello, los ovarios procedentes de ovejas adultas fueron recogidos en el matadero tras el sacrificio de los animales y transportados al laboratorio en una solución salina suplementada con 0.28 mM de penicilina a 30 °C en un período máximo de 3 h. Los complejos CCOs fueron obtenidos de los folículos tras realizar cortes en el ovario con la hoja de un bisturí depositando el contenido en un medio 199 (M4530) suplementado con HEPES (11.56 mM), heparina (2 $\mu\text{L mL}^{-1}$) y gentamicina (4 $\mu\text{L mL}^{-1}$), previamente equilibrado (5 % CO_2 a 38.5 °C).

Una vez obtenidos los COCs, estos fueron madurados *in vitro* como describió García-Álvarez et al. [53] en medio 199 suplementado con cisteamina (100 μM), FSH y LH (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), FCS (10%) y gentamicina (40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) en 5% CO_2 a 38.5 °C. Tras 24 h, las células del cúmulus fueron eliminadas suavemente utilizando una pipeta. El medio utilizado para lavar los ovocitos y realizar el co-cultivo con los espermatozoides fue el medio SOF. Posteriormente,

los ovocitos ($n = 478$) fueron depositados en placas de 4 pocillos con 450 μL de SOF suplementado con PVA (0.1 % (p/v)).

Las muestras espermáticas descongeladas procedentes de tres ciervos fueron mezcladas y seleccionadas mediante centrifugación en un gradiente de diferente densidad de Percoll[®] (45%/90%) a 700 g durante 10 min. El sobrenadante fue retirado y una parte del pellet fue diluido en medio CAP hasta una concentración de $10 \cdot 10^6$ espermatozoides mL^{-1} para su incubación durante 5, 15, 30 y 60 min (CAP 5, 15, 30 y 60). Como control negativo, el resto del pellet fue diluido hasta la misma concentración espermática utilizando el medio NCAP y los ovocitos fueron inseminados inmediatamente después de la dilución de los espermatozoides sin someterlos a ningún periodo de incubación (NCAP 0 min). La incubación de todas las muestras espermáticas fue llevada a cabo en un 5 % de CO_2 a 38.5 °C.

Una vez transcurridos los diferentes tiempos de incubación citados anteriormente, se inseminaron los ovocitos depositando para ello $1 \cdot 10^6$ espermatozoides mL^{-1} por pocillo y coincubando los gametos durante 18 h en un 5 % de CO_2 , 5 % de O_2 y 90 % de N_2 a 38.5 °C. Posteriormente, los presuntos cigotos se lavaron y se cultivaron en SOF suplementado con BSA (3 mg mL^{-1}) durante 24 h en las mismas condiciones en las que se realizó la co-incubación de los gametos. El porcentaje de ovocitos divididos (tasa de división) fue evaluado a las 48 h post-inseminación (h.p.i.) mediante estereomicroscopio (Nikon SMZ 1500) y fue expresado respecto al número total de ovocitos.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos (media \pm error estándar de la media (EEM)) fueron analizados con el programa SPSS 24.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). La normalidad de los datos fue verificada por una prueba Kolmogorov-Smirnov. Cuando fue necesario, los datos se transformaron en arcoseno. Se realizaron 4 réplicas de cada experimento.

Se llevó a cabo un análisis ANOVA factorial para evaluar el efecto del tiempo de incubación (1, 5, 15, 30, 45, 60, 120 min y 24 h) en condiciones de capacitación sobre los diferentes parámetros espermáticos, a excepción de la fertilidad *in vitro* en la que se evaluaron los siguientes tiempos de incubación: 5, 15, 30 y 60 min. Por otro lado, se realizó otro análisis ANOVA factorial para evaluar el efecto del tiempo de incubación (120 min) en condiciones no capacitantes sobre los diferentes parámetros espermáticos. En todos los análisis se consideraron los diferentes tiempos de incubación y la réplica como efectos fijos. Se consideró que existieron diferencias significativas para el factor a estudiar cuando $P < 0.05$. Cuando el ANOVA reveló un efecto significativo, los valores fueron comparados por el test de Bonferroni.

Para estudiar la relación entre los parámetros espermáticos evaluados y la tasa de división a las 48 h.p.i., se determinó el coeficiente de correlación de Pearson. Las correlaciones evaluadas se consideraron significativas cuando $P < 0.05$.

Resultados

Cambios en los parámetros de motilidad durante la incubación de las muestras espermáticas en condiciones de capacitación

Los espermatozoides incubados en medio CAP mostraron un descenso significativo de los valores de la MT y VCL a los 45 min y a los 30 min para la ALH, en relación al NCAP (Figura 1 a, b y d). Sin embargo, la LIN sólo disminuyó de forma significativa tras 24 h de incubación en este tipo de muestras (Figura 1c). Por otra parte, la MT, VCL y LIN no disminuyeron tras 120 min de incubación para las muestras NCAP, pero sí la ALH para este tipo de muestras (Figura 1).

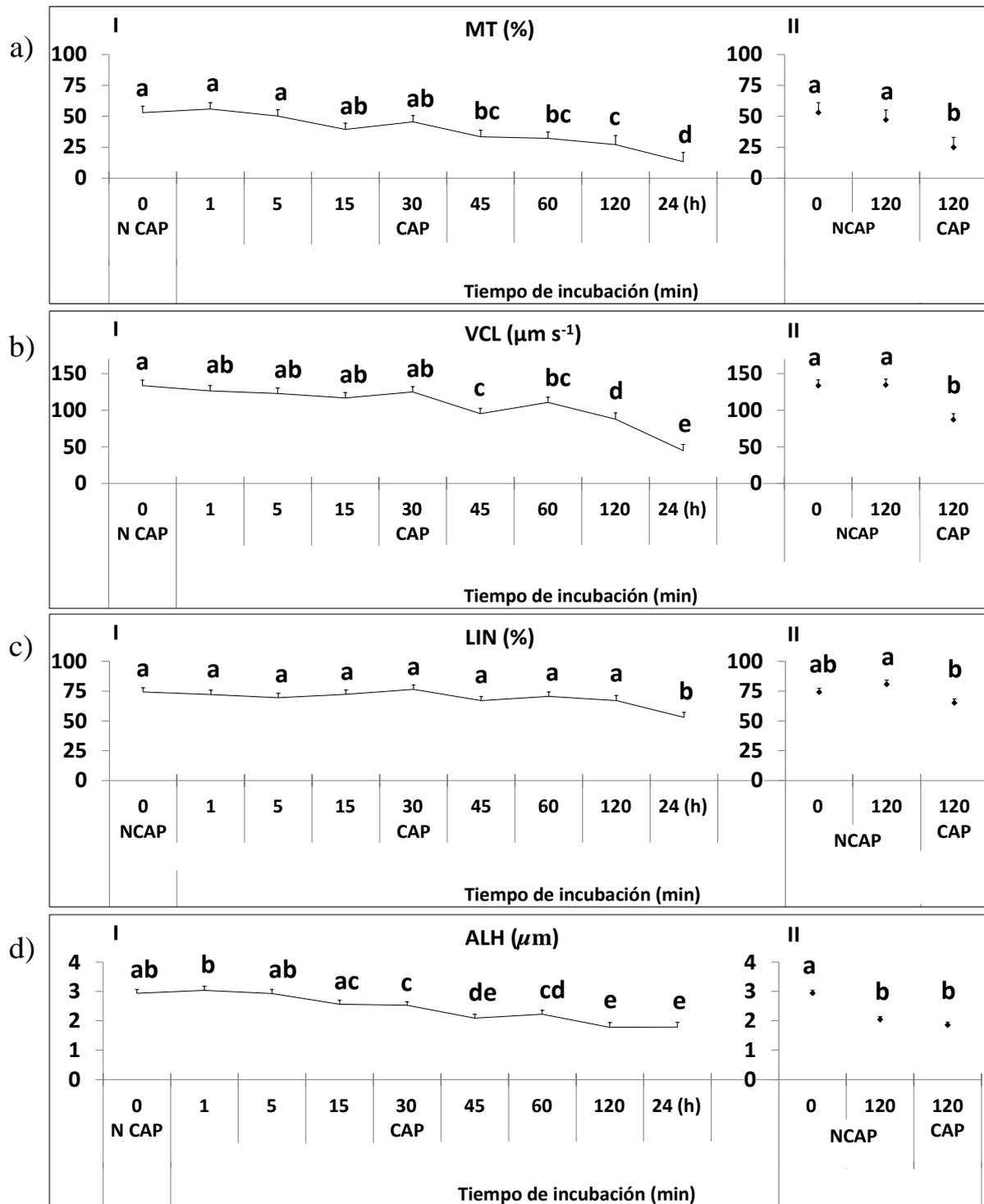


Figura 1. Evolución de los parámetros de motilidad de muestras espermáticas de ciervo Ibérico durante la incubación en medio CAP y NCAP (control negativo). (a) MT (%): motilidad total; (b) VCL ($\mu\text{m s}^{-1}$): velocidad curvilínea; (c) LIN (%): índice de linealidad; (d) ALH (μm): amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide. Valores con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes tiempos de incubación.

Cambios en los parámetros espermáticos evaluados mediante citometría de flujo durante la incubación de las muestras espermáticas en condiciones de capacitación

Tal y como se observa en la Figura 2, el porcentaje de espermatozoides vivos disminuyó de forma significativa en condiciones de capacitación a partir de los 45 min en relación al NCAP, aumentando a partir de ese tiempo el porcentaje de espermatozoides no viables. Igualmente, las muestras espermáticas incubadas en el medio NCAP disminuyeron su viabilidad tras 120 min de incubación, aumentando el porcentaje de espermatozoides muertos y apoptóticos, aunque la disminución de la viabilidad y el aumento del porcentaje de espermatozoides muertos fue más drástica para las muestras incubadas en condiciones de capacitación a ese mismo tiempo (Figura 2).

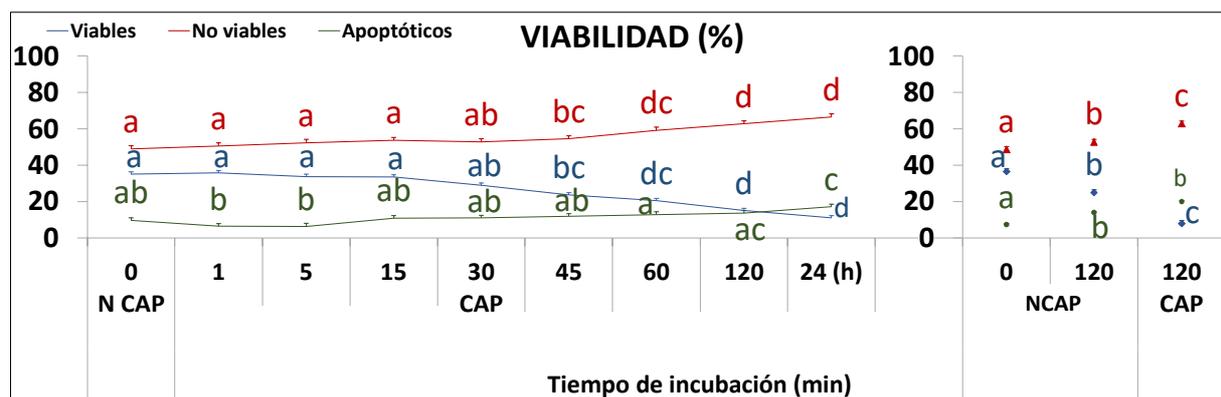


Figura 2. Evolución de la proporción de espermatozoides viables, apoptóticos y no viables (muertos) de muestras espermáticas de ciervo Ibérico incubadas en medio CAP y NCAP (control negativo). Valores con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes tiempos de incubación.

Por otra parte, en la Figura 3 observamos que el porcentaje de espermatozoides viables con acrosomas intactos en las muestras espermáticas incubadas en condiciones de capacitación disminuyó significativamente a los 15 min de incubación respecto al NCAP. Igualmente, este parámetro disminuyó tras 120 min de incubación en las muestras NCAP, siendo más marcado para las muestras incubadas en condiciones de capacitación (Figura 3).

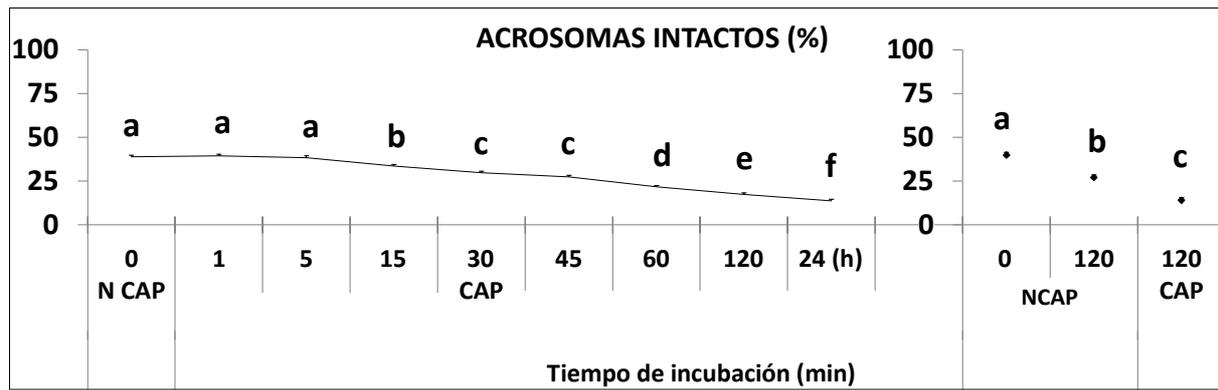


Figura 3. Evolución de la proporción de espermatozoides viables con acrosomas intactos en muestras espermáticas de ciervo Ibérico incubadas en medio CAP y NCAP (control negativo). Valores con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes tiempos de incubación.

Cuando estudiamos la evolución de la actividad mitocondrial, observamos que en las muestras incubadas en condiciones de capacitación el porcentaje de espermatozoide viables con mitocondrias activas disminuyó significativamente a los 60 min de incubación respecto al NCAP (Figura 4). Igualmente, tras 120 min de incubación en condiciones NCAP el porcentaje de espermatozoides con mitocondria activa disminuyó en relación al NCAP a los 0 min. A ese mismo tiempo, la disminución fue más drástica para las muestras incubadas en condiciones de CAP.

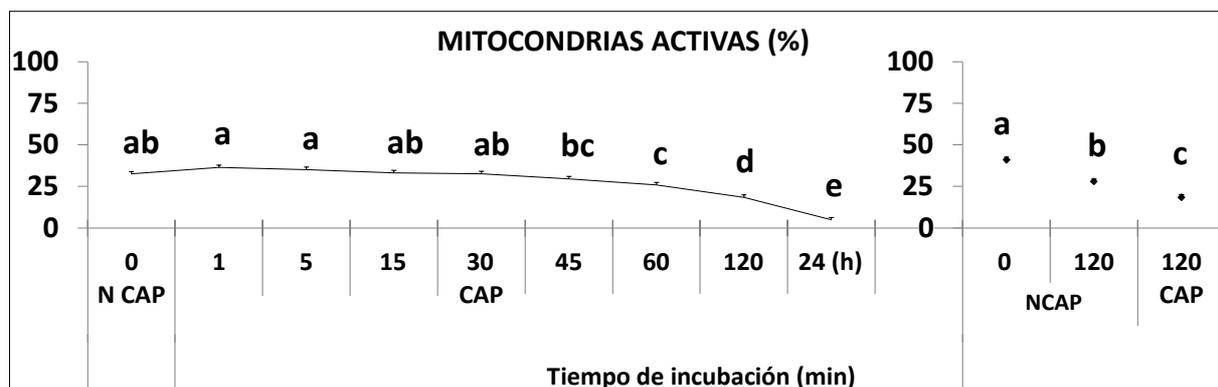


Figura 4. Evolución de la proporción de espermatozoides viables con mitocondrias activas en muestras espermáticas de ciervo Ibérico incubadas en medio CAP y NCAP (control negativo). Valores con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes tiempos de incubación.

El porcentaje de espermatozoides viables con mayor desorden de fosfolípidos de la MP de la MP aumentó de forma significativa desde el primer minuto de incubación en las muestras incubadas en medio CAP comparado con NCAP a 0 min, manteniéndose constante esta

población de espermatozoides a lo largo de todo el período de incubación en las muestras incubadas en condiciones de capacitación (Figura 5). Igualmente, para las muestras NCAP, aumentó el porcentaje de espermatozoides con mayor desorden de fosfolípidos de la MP tras 120 min de incubación, aunque este aumento fue mayor para los espermatozoides incubados en condiciones de capacitación a este mismo tiempo (Figura 5).

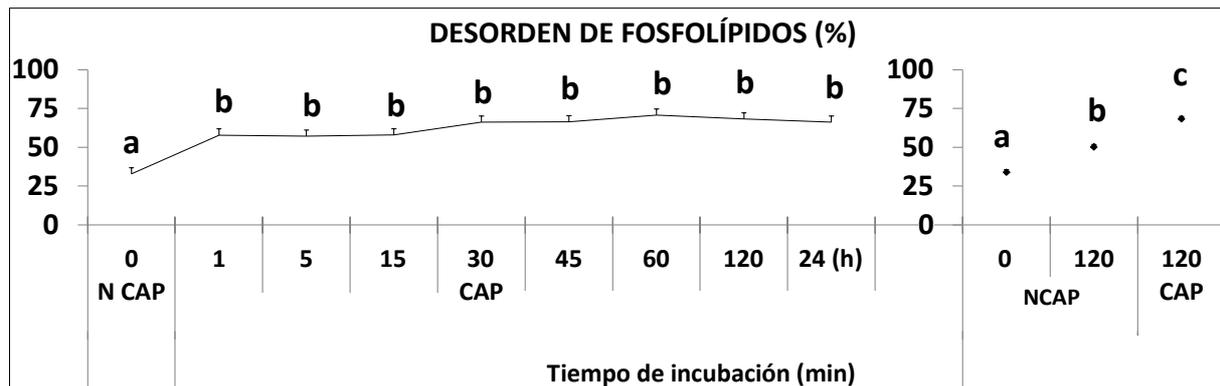


Figura 5. Evolución de la proporción de espermatozoides viables con mayor desorden de fosfolípidos de la MP en muestras espermáticas de ciervo Ibérico incubadas en medio CAP y NCAP. Valores con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes tiempos de incubación.

La producción de ROS no experimentó cambios significativos durante el período de incubación en condiciones de capacitación, observando sólo un aumento significativo a las 24 h respecto a los demás tiempos de incubación y a los valores registrados por el control negativo (Figura 6). Además, las muestras espermáticas incubadas en medio NCAP mostraron unos valores de producción de ROS significativamente más altos tras 120 min de incubación comparados con los obtenidos al principio de la incubación (0 min), así como respecto a los observados en las muestras incubadas durante el mismo tiempo en medio CAP (Figura 6).

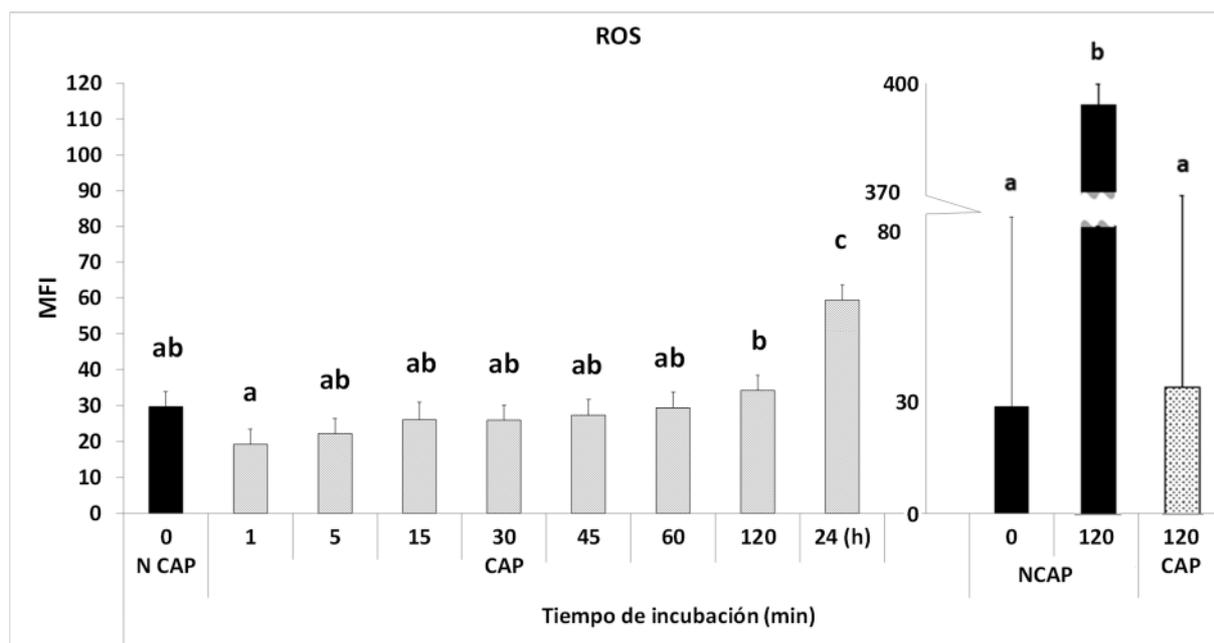
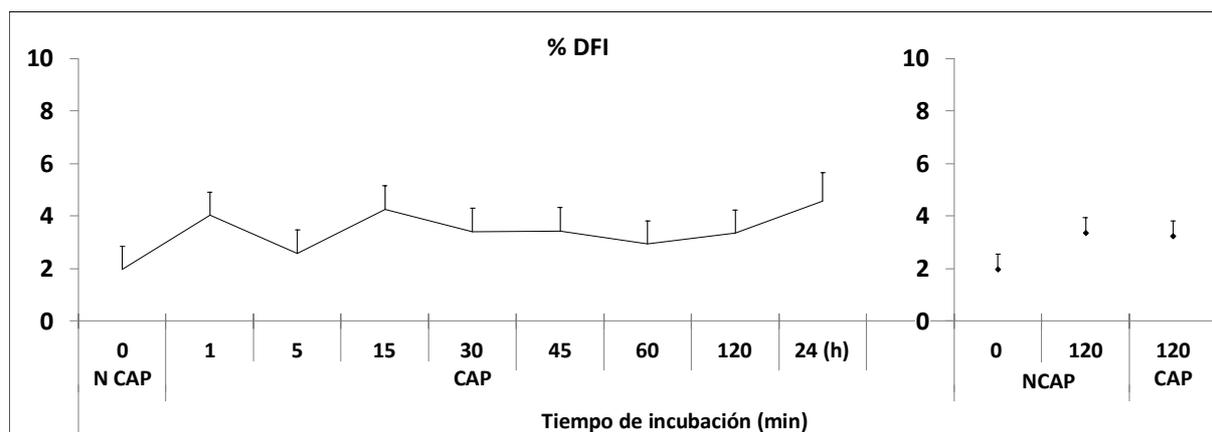


Figura 6. Evolución de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) de muestras espermáticas de ciervo Ibérico incubadas en medio CAP y NCAP (control negativo). Valores con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes tiempos de incubación.

No observamos cambios significativos a lo largo de la incubación para ningún tipo de muestra (CAP o NCAP) cuando se evaluó el porcentaje de espermatozoides con daño en el ADN (%DFI) (Figura 7 a). Sin embargo, tras 5 min de incubación en condiciones de capacitación, las muestras espermáticas experimentaron un aumento significativo de la proporción de espermatozoides con mayor grado de descondensación de la cromatina (%HDS) respecto al inicio de la incubación (1 min), así como respecto a las muestras incubadas en medio NCAP (0 min) (Figura 7 b). Igualmente, el %HDS aumentó en las muestras NCAP tras 120 min de incubación en relación a tiempo inicial para este mismo tratamiento.

a



b

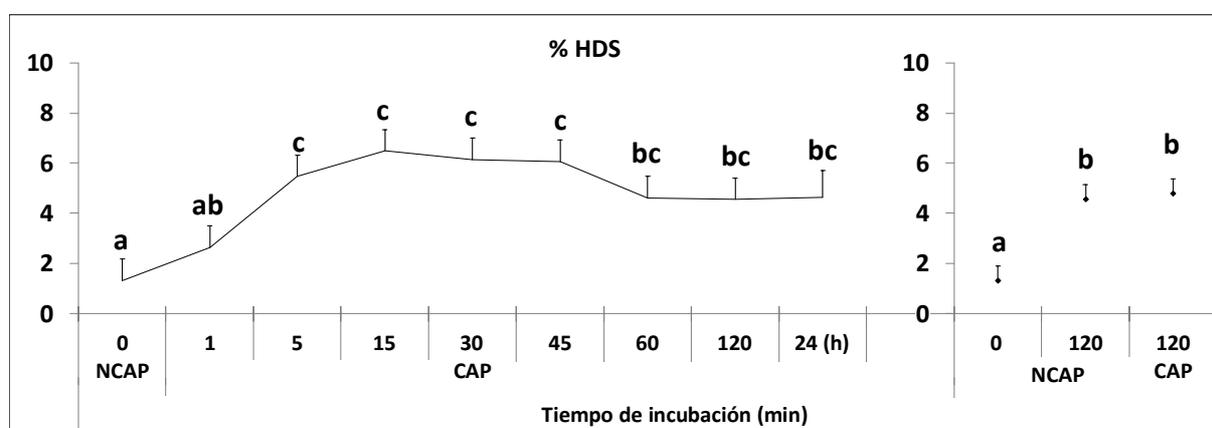


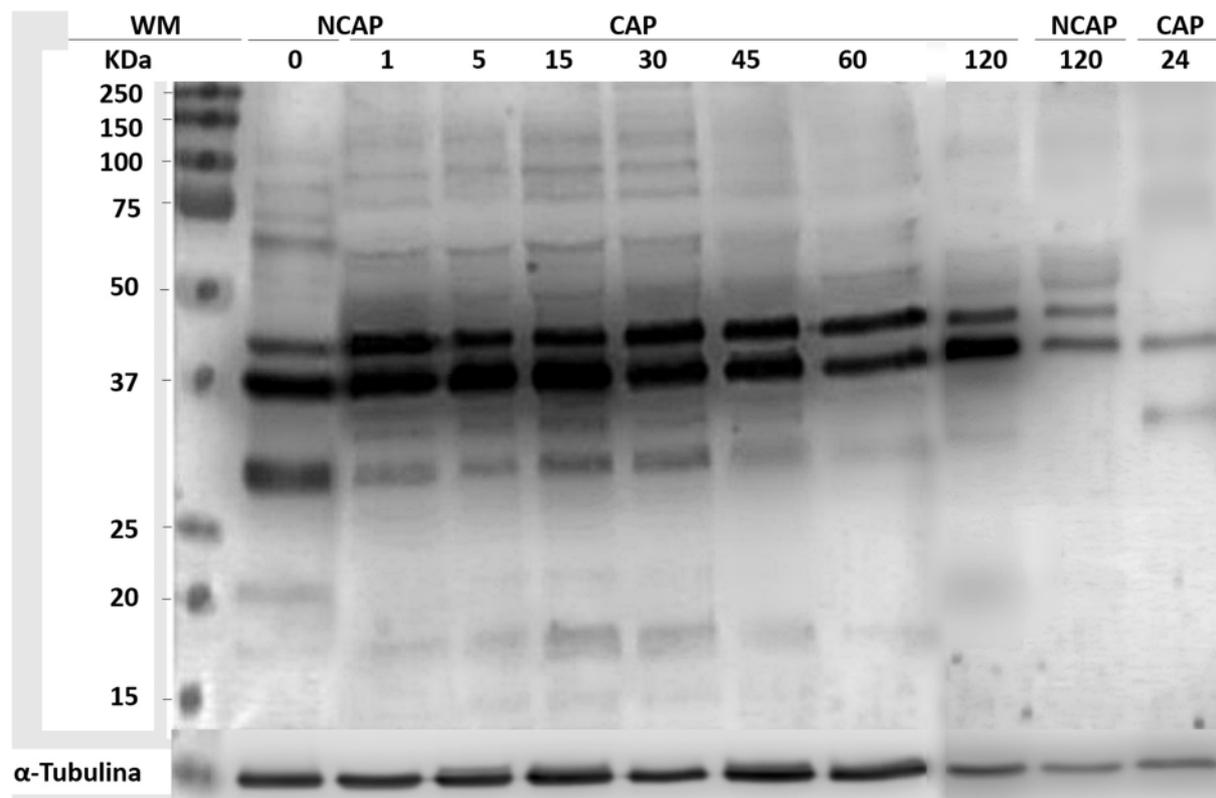
Figura 7. Evolución de la proporción de espermatozoides con daño en (a) el ADN (%DFI) y (b) con mayor grado de descondensación de la cromatina (%HDS) de muestras espermáticas de ciervo incubadas en medio CAP y NCAP (control negativo). Valores con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes tiempos de incubación.

Evolución de la fosforilación en tirosina durante la incubación de las muestras espermáticas en condiciones de capacitación

La fosforilación de los residuos de tirosina aumentó significativamente desde el primer minuto de incubación en medio CAP respecto al control negativo, siendo máxima a los 30 min de incubación. Sin embargo, a partir de los 60 min los valores de Fosforilación en tirosina de las muestras incubadas en medio CAP fueron similares ($P > 0.05$) a las muestras del control negativo al principio de la incubación (0 min; Figura 8). Por otra parte, la Fosforilación en tirosina no aumentó en las muestras NCAP tras una incubación de 120 min en relación al tiempo

inicial para este mismo tratamiento, aunque si fue diferente y menor ($P < 0.05$) que para las muestras incubadas en condiciones de capacitación a ese mismo tiempo.

a



b

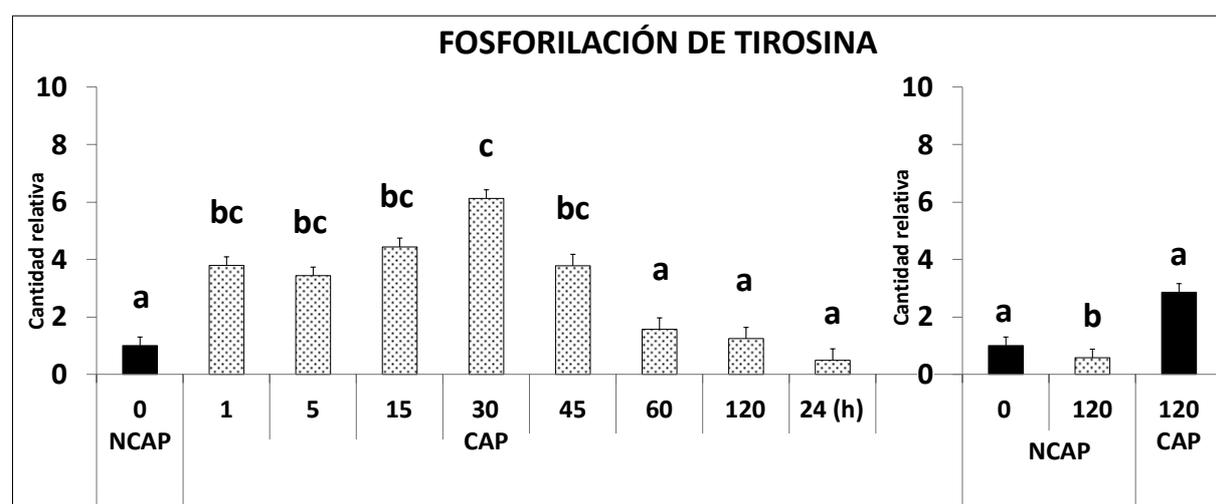
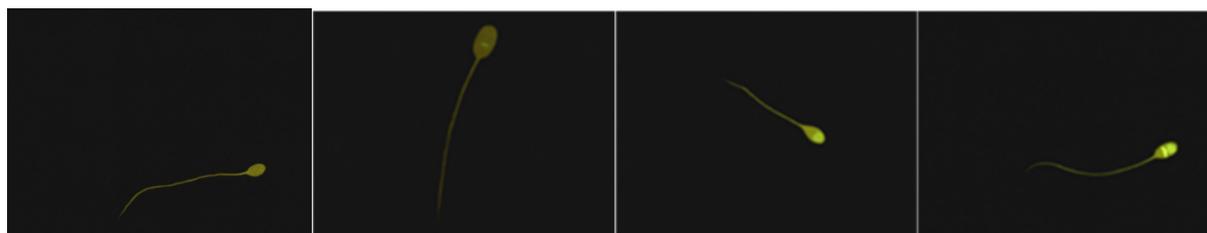


Figura 8. Evolución de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina (fosforilación en tirosina) de espermatozoides de ciervo incubados en medio CAP y NCAP. (a) Imagen representativa de una membrana del análisis de Western-Blot. (b) Niveles de fosforilación en tirosina de proteínas normalizada utilizando los valores de NCAP 0 min como referencia. Valores con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes tiempos de incubación.

Cuando se estudiaron los patrones de fosforilación en residuos de tirosina en las diferentes regiones del espermatozoide, observamos que tras 5 min de incubación en condiciones de capacitación aumentó de forma significativa la cantidad de espermatozoides que mostraban fluorescencia en la zona ecuatorial y acrosomal (Patrón IV) respecto al NCAP. Esta distribución de la fluorescencia se mantuvo hasta los 30 min de incubación, para disminuir de forma significativa a este tiempo. Además, a los 45 min de incubación, las muestras incubadas en medio CAP mostraron un aumento ($P < 0.05$) de espermatozoides con fosforilación sólo en la región acrosomal (Patrón III) respecto al control negativo y a todos los tiempos anteriores evaluados (5-30 min). Por su parte, la fosforilación en tirosina en la zona ecuatorial (Patrón II) disminuyó ($P < 0.05$) en relación al NCAP a partir de los 45 min en estas condiciones.

En relación a la dinámica de los espermatozoides incubados en condiciones NCAP se observó que no hubo cambios en la mayoría de los patrones de fosforilación en tirosina, excepto el patrón II que disminuyó ($P < 0.05$) tras 120 min de incubación en ese medio.

a



b

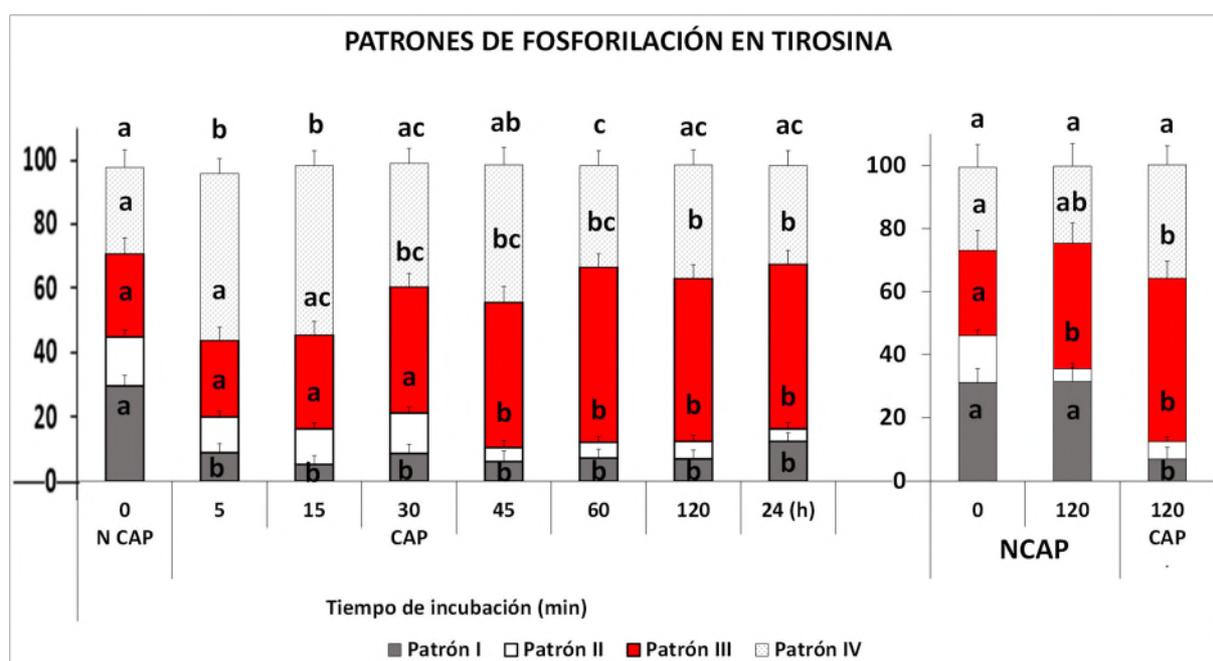


Figura 9. Patrones de fosforilación de los residuos de tirosina en espermatozoides de ciervo Ibérico evaluados mediante microscopía de fluorescencia (a). Patrón I: ausencia de fluorescencia; Patrón II: fluorescencia en región ecuatorial; Patrón III: fluorescencia en el acrosoma y Patrón IV: fluorescencia en la región ecuatorial y en el acrosoma. Porcentaje de espermatozoides que muestra cada patrón durante la incubación en medio CAP y NCAP (control negativo) (b). Valores con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes tiempos de incubación.

Fecundación in vitro heteróloga

Cuando las muestras espermáticas fueron incubadas en medio CAP durante 5, 15 y 30 min, la tasa de división observada, tras realizar un ensayo de FIV heteróloga, fue significativamente superior respecto a la obtenida con el control negativo (NCAP, 0 min). Sin embargo, el porcentaje de ovocitos divididos disminuyó tras la incubación de las muestras espermáticas en

medio CAP durante 60 min, siendo los valores similares a aquellas obtenidas tras la incubación de los espermatozoides en condiciones NCAP (Tabla 1).

Tabla 1. Tasas de división a las 48 h post inseminación (h.p.i.) utilizando muestras espermáticas de ciervo Ibérico incubadas en medio NCAP y CAP durante diferentes tiempos.

Tiempo de incubación (min)	NCAP		CAP		
	0	5	15	30	60
Tasa de división a las 48 h.p.i. (%)	4.1 ± 2.6 ^a	20 ± 2.6 ^b	20 ± 2.6 ^b	18 ± 2.6 ^{bc}	8 ± 2.6 ^{ac}

Diferentes superíndices indican diferencias significativas (P < 0.05) entre las medias. NCAP: control negativo.

NCAP: control negativo

Correlación de los parámetros espermáticos y las tasas de división a las 48 h.p.i.

Tras estudiar las correlaciones entre los parámetros espermáticos evaluados con los resultados de la FIV, observamos que la tasa de división a las 48 h.p.i. mostró una correlación positiva con el grado de descondensación de la cromatina (%HDS), la fosforilación en tirosina así como con el porcentaje de espermatozoides que mostraron fluorescencia en la región ecuatorial y acrosoma (Patrón IV) (Tabla 2).

Tabla 2. Coeficientes de correlación de los distintos parámetros espermáticos y la tasa de división a las 48 h.p.i.

Parámetro	r	P valor
MT (%)	-0.1	0.649
VCL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	-0.3	0.361
LIN (%)	-0.1	0.680
ALH (μm)	0.2	0.427
Espermatozoides viables (%)	-0.2	0.655
Espermatozoides no viables (%)	-0.6	0.813
Espermatozoides apoptóticos (%)	0.1	0.809
Espermatozoides viables con alto desorden de fosfolípidos (%)	0.2	0.441
Espermatozoides viables con acrosomas intactos (%)	-0.1	0.856
Espermatozoides viables con mitocondrias activas (%)	0.2	0.383
ROS (MFI)	-0.3	0.206
%DFI	0.3	0.283
%HDS	0.7	0.004
fosforilación en tirosina	0.7	0.002
Patrón I (%)	0.3	0.211
Patrón II (%)	0.2	0.434
Patrón III (%)	0.2	0.444
Patrón IV (%)	0.5	0.034

MT: motilidad total; VCL: velocidad curvilínea; LIN: índice de linealidad; ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide; ROS: producción de especies reactivas de oxígeno; MFI: del inglés “median fluorescence intensity”, media de intensidad de fluorescencia; %DFI: proporción de espermatozoides con daño en el ADN; %HDS: proporción de espermatozoides con mayor grado de descondensación de la cromatina; fosforilación en tirosina: fosforilación de los residuos de tirosina; Patrón I: ausencia de fluorescencia; Patrón II: fluorescencia triangular en el segmento ecuatorial; Patrón III: fluorescencia en la región acrosómica; Patrón IV: fluorescencia tanto en la región acrosómica como en el segmento ecuatorial.

*En negrita se indican las diferencias significativas ($P < 0.05$).

Discusión

La capacitación espermática comprende una serie de eventos a nivel fisiológico, molecular y estructural que el espermatozoide debe desarrollar para adquirir la capacidad de fecundar el ovocito (Austin, 1951; Chang, 1951). Para que este proceso pueda inducirse *in vitro* en especies de pequeños rumiantes, como el ciervo, es esencial la presencia del ESS [7,76,92,99,133,134]. Nuestros resultados confirman que sólo cuando el ESS estuvo presente en el medio (CAP), los espermatozoides de ciervo mostraron características compatibles con la capacitación, además de fecundar una mayor proporción de ovocitos. Sin embargo, el tiempo de incubación en el medio CAP también afectó de manera significativa a los resultados observados.

Así, la motilidad, la viabilidad y la actividad mitocondrial de los espermatozoides de ciervo incubados en medio CAP disminuyeron de forma significativa cuando el período de incubación superó los 30-45 min, comprometiendo además su capacidad fecundante a los 60 min como mostraron las tasas de división obtenidas tras la FIV. Este comportamiento de los espermatozoides cuando avanzó el período de incubación sería consecuencia de la desestabilización de la MP que tuvo lugar al inicio de la capacitación (1 min). Durante esta fase se produce una redistribución de los fosfolípidos de la MP debido a la salida de colesterol de la misma, convirtiéndola en una estructura más fluida e inestable [148]. Como consecuencia de esta prematura desestabilización de la MP, los espermatozoides no sobreviven de forma prolongada en estas condiciones y están destinados a morir si la fecundación no se produce tras un corto periodo de tiempo una vez capacitados [45]. Nuestros resultados confirman esta hipótesis ya que la viabilidad espermática disminuyó a partir de los 45 min de incubación en medio CAP. No obstante, en las muestras incubadas sin la presencia de ESS también observamos una disminución en la viabilidad. Sin embargo, este descenso fue menos pronunciado en estas últimas

cuando ambos tipos de muestras fueron comparadas tras un tiempo de incubación similar (120 min), corroborando que tras el inicio de la CIV se aceleran los eventos de muerte celular, de manera similar a lo reportado en la especie bovina [149] y porcina [150]. Por otra parte, debemos considerar que durante la capacitación se necesita un requerimiento extra de energía [151–153], por lo que era de esperar que la motilidad y la actividad de las mitocondrias no se mantuviera durante largos períodos de tiempo en estas condiciones. Sin embargo, la evolución de estos parámetros a tiempos cortos de incubación en medio CAP demuestra la rapidez con la que ocurre la capacitación en los espermatozoides descongelados de ciervo, al igual que evidencian como superado este periodo de tiempo se compromete la funcionalidad de los mismos. Este aumento de la actividad metabólica que ocurre durante la capacitación [154] está asociado con un aumento en la producción de ROS [155]. Además, un nivel adecuado de ROS durante la capacitación es crítico ya que procesos claves, como la fosforilación en residuos de tirosina no podrán desarrollarse si los ROS sobrepasan la capacidad antioxidante del espermatozoide [156], favoreciendo que se inicien procesos apoptóticos en la célula [157]. Nuestros resultados muestran el efecto antioxidante ejercido por el ESS evitando que se acumulen altos niveles de ROS a lo largo de la incubación en condiciones de capacitación, observando que estos no aumentaron hasta las 24 h de incubación en medio CAP. Sin embargo, en las muestras donde el ESS no estuvo presente (NCAP) las cantidades de ROS aumentaron significativamente tras 120 min de incubación. Estos resultados coinciden con los observados por otros autores en la especie ovina [107,52] y demuestran el importante efecto del ESS regulando los niveles de ROS necesarios para que se desarrolle la capacitación.

Otro de los efectos que ha sido atribuido al ESS es su capacidad para promover la reacción acrosómica (RA) [51], probablemente por la presencia de progesterona en su

composición [158], la cual es capaz de inducir este fenómeno en espermatozoides capacitados [159,160]. Aunque la RA no fue inducida en nuestro trabajo, otros investigadores han observado altos porcentajes de RA espontánea durante la CIV de espermatozoides descongelados de bovino [161]. Así, observamos que la integridad de los acrosomas comenzó a disminuir a partir de los 15-30 min de incubación de las muestras en medio CAP. Por otra parte, diferentes autores han reportado que la desestabilización de la MP durante la capacitación predispone al espermatozoide a la pérdida del acrosoma debido a la formación de poros entre ambas membranas favoreciendo su fusión y la exocitosis del contenido acrosomal [161,162].

El aumento del desorden de fosfolípidos de la MP desencadena en el espermatozoide eventos de transducción de señales que culminan con la fosforilación de proteínas [35]. Nuestros resultados muestran que, coincidiendo con el aumento del desorden de fosfolípidos de la MP, se produjo un aumento de la fosforilación en residuos de tirosina en el primer minuto de la incubación en medio CAP. Sin embargo, la fosforilación se considera un evento tardío durante la capacitación y depende de la especie y del tipo de muestra espermática, observándose que en espermatozoides frescos de morueco ocurre a las 2 h [116] mientras que en bovino y porcino ocurre a las 3-4 h de incubación [163,164]. El rápido incremento de la fosforilación observado al inicio de la incubación en medio CAP probablemente fue consecuencia del proceso de criopreservación, el cual acelera los eventos asociados a la capacitación según ha sido reportado en ovino [52] y bovino [149,161]. Así, observamos también al inicio en las muestras NCAP (0 min), un porcentaje de espermatozoides que mostraban alta desorden de fosfolípidos de la MP y fosforilación en residuos de tirosina, confirmando el fenómeno conocido como criocapacitación que ha sido descrito en diferentes especies [165]. Sin embargo, la presencia de ESS fue imprescindible para inducir el incremento de

fosforilación pues los espermatozoides incubados en condiciones NCAP no experimentaron un aumento de la fosforilación a lo largo de la incubación. Por otra parte, y al igual que para el resto de los parámetros espermáticos evaluados en las muestras espermáticas CAP, a los 45 min de incubación la fosforilación disminuyó significativamente hasta alcanzar los valores iniciales. Aunque el incremento de la fosforilación en residuos de tirosina observado en los espermatozoides de ciervo incubados en medio CAP coincide con lo reportado previamente en ciervo [50] hasta la fecha no existen trabajos en ciervo que hayan mostrado los cambios funcionales y moleculares que experimentan los espermatozoides cuando son incubados bajo condiciones de capacitación. Esta información es esencial para obtener resultados óptimos en la producción *in vitro* de embriones en esta especie de rumiante silvestres, ya que los resultados reportados son muy variables en los pocos trabajos que hay realizados [75–77,79,166].

En nuestro estudio, además, se identificaron diferentes patrones de fosforilación en tirosina en los espermatozoides a lo largo de la incubación en medio CAP observando que a tiempos cortos de incubación (< 30 min) la fosforilación tuvo lugar principalmente en la zona ecuatorial y acrosomal (Patrón IV) para posteriormente mostrarla sólo en la región acrosomal (Patrón III). Estos patrones que varían durante la incubación en el medio CAP serían también resultado de la heterogeneidad de las muestras espermáticas que responden de forma diferente a la capacitación [167,168]. Por otra parte, y coincidiendo con el inicio de la disminución de la viabilidad (45 min) observamos una menor proporción de espermatozoides con fosforilación en la región ecuatorial (Patrones II y IV) de manera similar a lo que ocurre en espermatozoides descongelados de toro [161]. Esta distribución de la fosforilación en la cabeza espermática se asocia a eventos de fusión con el ovocito [169–171] en la especie humana [172], porcina [130] y bovina [173].

Cuando evaluamos el grado de descondensación de la cromatina (%HDS) de los espermatozoides de ciervo observamos un incremento al principio de la incubación en el medio CAP que se mantuvo constante y superior al observado en las muestras NCAP. La descondensación de la cromatina durante el proceso de capacitación ha sido reportado en espermatozoides frescos y descongelados de diferentes especies durante la capacitación [174–176], probablemente como preparación para su posterior remodelación tras la fecundación del ovocito garantizando una correcta formación del pronúcleo masculino y del cigoto [177]. Este aumento del %HDS en los espermatozoides incubados en medio CAP no fue paralelo a un aumento del %DFI, demostrando que nuestras condiciones de capacitación no provocaron daño en el ADN de los espermatozoides de ciervo.

Por último, cuando observamos las tasas de división de ovocitos tras un test de FIV, corroboramos, por una parte, que la presencia de ESS es necesaria para lograr mayores tasas de fecundación, aunque tiempos prolongados de incubación (60 min) en estas condiciones (medio CAP) disminuyeron los porcentajes de ovocitos divididos. Además, demostramos la importancia de la fosforilación de los residuos de tirosina, la proporción de espermatozoides que muestran fosforilación en la región ecuatorial y acrosomal y el %HDS para incrementar la capacidad fecundante de los espermatozoides de ciervo. Estos últimos resultados fueron obtenidos tras realizar un análisis de correlaciones entre los diferentes parámetros espermáticos estudiados y las tasas de división de ovocitos, observando sólo correlaciones positivas y significativas para los parámetros citados anteriormente.

Con todo ello, podemos concluir que los espermatozoides descongelados de ciervo desarrollan un comportamiento compatible con la capacitación (aumento del desorden de fosfolípidos de la MP y de la fosforilación en residuos de tirosina) cuando son incubados en medio CAP. Por otra parte, la funcionalidad del espermatozoide varía a lo largo de la

incubación en estas condiciones, posiblemente debido a la inestabilidad que presenta la célula tras el proceso de congelación. La disminución o pérdida de estructuras y eventos claves durante la capacitación podrían ser las causas de las bajas tasas de FIV observadas en tiempos largos (60 min) de incubación en condiciones de capacitación de los espermatozoides de esta especie. Más estudios son necesarios para determinar las mejores condiciones a aplicar en la FIV cuando se utilizan espermatozoides descongelados de ciervo Ibérico.

CAPÍTULO III

**Efecto de la concentración de BSA sobre la capacitación
espermática de espermatozoides descongelados de ciervo
Ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*)**

Resumen

A pesar de que una apropiada inducción a la capacitación espermática es un requisito fundamental para la producción de embriones *in vitro*, hasta la fecha, no se ha definido ningún medio que permita capacitar *in vitro* con éxito los espermatozoides de ciervo sin la presencia de ESS. El objetivo de este estudio ha sido explorar el efecto de diferentes concentraciones de albumina sérica bovina (BSA) como posible alternativa al uso de ESS en el medio de capacitación de los espermatozoides descongelados de ciervo Ibérico. Para ello, muestras espermáticas de tres ciervos adultos fueron descongeladas y procesadas conjuntamente, dividiéndolas en 9 partes. Siete partes fueron diluidas en un fluido sintético oviductal (SOF) suplementado con diferentes concentraciones de BSA (0.003, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30 mg mL⁻¹), una parte fue diluida en un medio suplementado con 20 % de ESS como control positivo (CAP) y la parte restante en un medio sin ESS, como control negativo (NCAP). Tras la dilución, todas las muestras espermáticas fueron incubadas durante 15 min en 5 % CO₂ a 38.5 °C. Parámetros espermáticos relacionados con la motilidad, integridad de la membrana acrosomal, integridad y desorden de fosfolípidos de la MP de la MP, actividad mitocondrial, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la fosforilación de los residuos de tirosina fueron evaluados tras la incubación. Nuestros resultados mostraron que a partir de una concentración de 3 mg mL⁻¹ de BSA en el medio de capacitación, el porcentaje de espermatozoides vivos y de espermatozoides viables con mitocondria activa disminuyeron en relación a las muestras capacitadas (33.67 ± 1.27, 33.89 ± 1.27, 32.92 ± 1.27 y 41.27 ± 1.27 % de espermatozoides vivos para las muestras SF-BSA 3, 10, 30 y CAP, respectivamente; 30.54 ± 1.61, 30.72 ± 1.61, 30.34 ± 1.61 y 36.54 ± 1.61 % de espermatozoides viables con mitocondrias activas para las muestras SF-CAP 3, 10, 30 y CAP, respectivamente). Sin embargo, a partir de una concentración de 0.1 mg mL⁻¹ de BSA en el medio de

capacitación el porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado fue menor que para las muestras capacitadas (1.54 ± 0.57 vs. 6.99 ± 0.57 % para las muestras SF-BSA 0.1 y CAP, respectivamente). Los niveles de ROS fueron similares a los obtenidos por el medio CAP para aquellos medios con una concentración igual o superior a 0.1 mg mL^{-1} de BSA, y menores en relación al medio NCAP. Finalmente, para los valores de fosforilación en tirosina no existieron diferencias entre los medios con diferentes concentraciones de BSA y ambos controles, sin embargo, el valor observado tras la incubación en el medio CAP fue significativamente superior al obtenido con el control negativo (3 ± 0.2 vs. 1 ± 0.2 para el medios CAP y NCAP, respectivamente). A partir de nuestros resultados se puede concluir que, aunque no existieron diferencias en fosforilación en tirosina para las diferentes concentraciones de BSA evaluadas en relación a los medios control, el uso de BSA resultó adecuado para neutralizar las ROS y reducir el daño acrosomal. No obstante, altas concentraciones de BSA (de 3 mg mL^{-1} de BSA en adelante) parecen disminuir la viabilidad y la actividad mitocondrial de los espermatozoides de ciervo durante la capacitación.

Introducción

La capacitación espermática es un proceso fisiológico que deben desarrollar los espermatozoides de mamíferos para adquirir la capacidad de fecundar el ovocito [38,94]. Este proceso es común a todas las especies, aunque existen diferencias entre ellas las cuales van a condicionar la respuesta a los distintos agentes capacitantes cuando este proceso es llevado a cabo *in vitro* [82,178–180]. En los pequeños rumiantes se han llevado a cabo numerosas investigaciones que ponen de manifiesto la dificultad de estandarizar el proceso de capacitación espermática en el laboratorio [117,181]. Hasta la fecha, los mejores resultados han sido obtenidos suplementando los medios de capacitación con ESS [7,88,52]. Así, se ha demostrado en ovino [95,52] y ciervo [50] como el ESS es capaz de promover cambios compatibles con la capacitación como el incremento de fosforilación de tirosina y el aumento del desorden de fosfolípidos de la MP a través de la eliminación del colesterol de su estructura, lo que permite, finalmente la fecundación de ovocitos. No obstante, su utilización conlleva una alta variabilidad experimental que impide la reproducibilidad de los datos [54].

En el diseño de un medio de capacitación espermática definido o semidefinido, se deben utilizar sustancias que promuevan cambios en el espermatozoides similares a los que promueve el ESS y que les permitan capacitarse y finalmente fecundar el ovocito. Dentro de los cambios característicos que se producen durante la capacitación, tiene lugar la hiperpolarización de la MP debido a la activación de varios canales iónicos que aumentan su permeabilidad a iones Ca^{2+} y HCO_3^- [39]. La entrada de ambos electrolitos activa la adenilato ciclasa, que aumenta el AMPc y los eventos de fosforilación en residuos de tirosina de proteínas, procesos claves en la capacitación espermática. Además, el incremento de la concentración de HCO_3^- produce una reorganización de los lípidos de la MP [182] que inducen la pérdida de colesterol que es captado por la albúmina. Debido

a que la BSA ofrece beneficios similares al ESS en lo que se refiere a su capacidad como acceptor de colesterol, diversos autores han empleado BSA durante la capacitación de espermatozoides de pequeños rumiantes [82].

La habilidad de la BSA para desencadenar la capacitación de los espermatozoides difiere entre especies. Mientras que en ratón y porcino la capacitación depende de la presencia de BSA en el medio [36,180], esta sustancia parece menos importante en la especie equina, llegando a bloquear la fosforilación de tirosina [90] o la salida del colesterol asociadas la capacitación [183]. Recientemente, en ovino se ha demostrado que, si bien no ejerce una acción fundamental como agente capacitante [178], su presencia mejora la eficiencia general de los medios de capacitación [82]. Por su parte, en ciervo, aunque la BSA estimula de forma adecuada la capacitación de espermatozoides descongelados resulta menos eficiente que el ESS con independencia de la concentración de BSA empleada [50]. No obstante, en este estudio la capacitación fue evaluada después de tiempos largos de incubación (2 y 4 h) a partir de los cuales, según los datos (no publicados) obtenidos por nuestro grupo de investigación, el potencial fecundante se reduce. Además, el efecto que ejerce la BSA sobre la funcionalidad de los espermatozoides de ciervo es todavía incierto, por lo que su viabilidad como sustituto del ESS en los medios de capacitación está aún por determinar.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de BSA como agente capacitante para los espermatozoides descongelados de ciervo Ibérico.

Materiales y métodos

8. Reactivos

Salvo que se indique lo contrario todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Madrid, España). Los fluorocromos fueron obtenidos de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, USA).

9. Recogida y criopreservación espermática

Las muestras espermáticas procedieron del Banco de Germoplasma de la Universidad de Castilla-La Mancha (UCLM) (ES07RS02OC) siguiendo el RD 841/2011. Se utilizaron dosis de 3 machos adultos (> 2 años de edad) de ciervo Ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*). Los eyaculados fueron obtenidos durante la época reproductiva (mediados del mes de septiembre) mediante electroeyaculación como describió Martínez-Pastor et al. [138]. Los ciervos fueron inmovilizados y anestesiados con una inyección intravenosa de xilacina (0.75 mg kg^{-1} ; Rompun[®]; Bayer AG, Leverkusen, Alemania) y ketamina (1.5 mg kg^{-1} ; Imalgene 1000[®]; Rhone-Mérieux, Lyon, Francia). Las heces fueron retiradas del recto y la zona del prepucio fue lavada con solución salina fisiológica (ver Anexo I). La electroeyaculación fue llevada a cabo utilizando una sonda con una longitud de 375 mm y una anchura de 40 mm; la longitud de los electrodos fue de 80 mm. La sonda estuvo conectada a una fuente que permitió controlar tanto el voltaje como el amperaje. La eyaculación de los animales ocurrió a unos valores medios de 4.5 V y 90 mA (el tiempo medio registrado hasta la eyaculación fue de 3 min). La anestesia fue revertida con clorhidrato de yohimbina (0.3 mg kg^{-1} ; preparado al 0.9 %; Sigma, Madrid, España).

El eyaculado fue recogido en fracciones en tubos graduados atemperados. La presencia de orina fue analizada en cada fracción de eyaculado recogido mediante tiras reactivas de urea (Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Alemania), siendo descartadas las fracciones contaminadas. El resto de las fracciones del eyaculado que presentaban una

motilidad similar fueron mezcladas y mantenidas en un baño térmico con solución salina fisiológica a 30 °C hasta su congelación que se realizó siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

El semen fue diluido hasta una concentración final de 200×10^6 espermatozoides mL^{-1} en un diluyente Triladyl® (Minitüb, Tiefenbach, Alemania) suplementado con 20 % (v/v) de yema de huevo. Las muestras diluidas fueron enfriadas lentamente (desde 37 °C a 5 °C) durante 90 min y mantenidas a 5 °C durante 2 h. Tras este período, las muestras fueron envasadas en pajuelas de 0.25 mL (Minitüb, Tiefenbach, Alemania) y congeladas en vapores de nitrógeno (a una altura de 4 cm sobre el nivel de nitrógeno líquido) durante 10 min como describió Soler et al. [136]. Posteriormente, las pajuelas fueron sumergidas en nitrógeno líquido, donde permanecieron almacenadas hasta su utilización.

10. *Diseño experimental*

Las muestras de tres ciervos adultos fueron utilizadas para este estudio, las cuales se procesaron juntas para eliminar diferencias individuales. La descongelación de las pajuelas se realizó mediante inmersión en un baño térmico con solución salina fisiológica a 37 °C durante 30 s. A continuación, se realizó una centrifugación en un gradiente de diferente densidad de Percoll® (45%/90%) a 700 g durante 10 min con el objetivo de eliminar el plasma seminal, el diluyente de congelación y aumentar la proporción de espermatozoides viables [53]. Tras la centrifugación, el sobrenadante fue retirado y los espermatozoides fueron diluidos hasta una concentración de 10×10^6 espermatozoides mL^{-1} en los diferentes medios evaluados. Como medio base se utilizó un SOF [141] ligeramente modificado (mSOF), formulado sin BSA y con 5 mM de Ca^{2+} y 25 mM de NaHCO_3 (ver Anexo I) al que se le añadió un 20 % (v/v) de ESS (CAP) para el control positivo, o un 0.1 % (p/v) de PVA para el control negativo de capacitación (NCAP). Los medios de capacitación bajo estudio (SF-BSA) se formularon con el mismo medio base

que los controles (mSOF), sustituyendo el ESS y PVA por concentraciones crecientes de BSA: 0.003, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30 mg mL⁻¹. Todas las muestras espermáticas fueron incubadas durante 15 min en un 5 % de CO₂ a 38.5 °C evaluando diferentes parámetros tras la incubación. El experimento fue replicado cuatro veces.

11. *Evaluación de parámetros de motilidad espermática objetiva*

La motilidad objetiva de los espermatozoides fue evaluada mediante el software Sperm Class Analyzer (SCA[®], Microptic 2002) como describió Anel-López et al. [144]. Se capturaron, al menos, 10 campos por muestra espermática utilizando una cámara Basler A302 fs digital (Basler Vision Technologies, Ahrensburg, Alemania) acoplada a un ordenador mediante un conector IEEE 1394. El tamaño de las imágenes fue de 768 x 576 píxeles. La velocidad de adquisición fue de 50 imágenes s⁻¹ y el tamaño de la cabeza de los espermatozoides se limitó a un área comprendida entre 20-90 μm². Para cada muestra, se registraron los siguientes parámetros: motilidad total (%), definida como porcentaje de espermatozoides con una velocidad > 10 μm s⁻¹ según la trayectoria curvilínea; velocidad según la trayectoria curvilínea (VCL, μm s⁻¹); índice de linealidad (LIN, %); y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza de los espermatozoides (ALH; μm).

12. *Análisis de parámetros espermáticos mediante citometría de flujo*

Debido al número de muestras tan amplio y a la gran batería de parámetros evaluados, se utilizaron dos citómetros de flujo simultáneamente para evitar que los diferentes análisis espermáticos se solaparan.

La viabilidad espermática, actividad mitocondrial y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) fueron evaluadas mediante un citómetro FC500 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) equipado con el software MXP (v.3). Mientras que la integridad del acrosoma fue evaluada mediante un citómetro Cell Lab Quanta SC (Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.) junto con el software Cell Lab Quanta SC Analysis. Los datos

obtenidos de ambos citómetros fueron analizados con el software WEASEL (WEHI, Melbourne, Australia). En todos los análisis se analizaron 10 000 eventos por muestra espermática. Todos los fluorocromos fueron excitados con un láser de 488 nm, mientras que el fluorocromo Mitotracker Deep Red fue excitado con un láser helio-neón de 633 nm. En el citómetro FC 500, la fluorescencia verde emitida por los fluorocromos YO-PRO[®]-1 y CM-H₂DCFDA fue detectada por el fotodetector FL-1 (filtro 530/28B); la fluorescencia roja emitida por el IP por el fotodetector FL-3 (620/40BP); y la fluorescencia emitida por el Mitotracker Deep Red por el fotodetector FL-4 (675/40BP). En el citómetro Cell Lab Quanta SC, la fluorescencia verde emitida por FITC fue detectada por el fotodetector FL-1 (filtro 510-540/BP) y la fluorescencia roja emitida por el IP por el fotodetector FL-3 (filtro 670/LP).

Para eliminar cualquier otro tipo de células diferente de la población principal de espermatozoides, se utilizó, en el citómetro FC500, un gráfico de puntos de la dispersión de la luz frontal vs. lateral y, en el citómetro Cell Lab Quanta SC, un gráfico de puntos de la dispersión de la luz lateral vs. el volumen electrónico de las células.

Las muestras espermáticas fueron diluidas hasta una concentración de 1×10^6 espermatozoides mL⁻¹ en las diferentes soluciones de tinción (descritas a continuación) preparadas en un medio SOF (ver Anexo I) suplementado con 0.1 % (p/v) de PVA y HEPES (2.35 mg mL⁻¹).

Para la evaluación de la viabilidad espermática se utilizó la combinación de los fluorocromos yoduro de propidio (IP; 12 μM (stock: 7.5 mM en agua desionizada)) y YO-PRO[®]-1 (50 nM (stock: 1 mM en DMSO)). La población de espermatozoides IP-/YO-PRO-1- fue considerada como espermatozoides viables; la población IP-/YO-PRO-1+ como espermatozoides apoptóticos; y la población IP+/YO-PRO-1+ fue considerada como espermatozoides no viables (muertos).

La actividad mitocondrial fue analizada con el fluorocromo MitoTracker® Deep Red (0.1 μM (stock: 1 mM en DMSO)) en combinación con YO-PRO®-1 (50 nM (stock: 1 mM en DMSO)). La población de espermatozoides MitoTracker+ / YO-PRO-1- fue considerada como espermatozoides viables con mitocondrias activas.

La integridad del acrosoma se evaluó mediante la combinación de los fluorocromos PNA-FITC (3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (stock: 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de agua desionizada) e IP (12 μM (stock: 7.5 mM en agua desionizada)). La población de espermatozoides PNA-FITC- /IP- fue considerada como espermatozoides viables con acrosomas intactos.

La producción de ROS fue evaluada con el fluorocromo CM-H₂DCFDA (5 μM (stock: 2 mM en DMSO) en combinación con IP (12 μM (stock: 7.5 mM en agua desionizada)). La población principal de espermatozoides viables (IP-) incubados en medio NCAP fue establecida por debajo de la primera década en la escala logarítmica del fotodetector FL-1 (filtro 530/28BP) como valor de referencia en el histograma. A partir de esta configuración, los niveles de ROS fueron representados como el valor medio de la fluorescencia de CM-H₂DCFDA de la población de espermatozoides IP- en cada muestra espermática.

13. *Análisis de la fosforilación de los residuos de tirosina*

La fosforilación de los residuos de tirosina fue analizada en las muestras espermáticas, diluidas en los diferentes medios (CAP, NCAP, SF-BSA: 0.003, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30) e incubadas durante diferentes períodos de tiempo, mediante Western-Blot. Para ello, las proteínas fueron extraídas como había sido descrito por [111]. Tras añadir b-mercaptoetanol al 5 %, las muestras espermáticas se llevaron a ebullición durante 3 min. Los extractos de proteínas procedentes de $5 \cdot 10^6$ de espermatozoides se cargaron en geles de poliacrilamida y se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE. Las proteínas se sometieron a electro-transferencia en membranas de PVDF (Bio-Rad) a 250 mA durante

120 min a 5 °C. Los sitios no específicos de las membranas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente en un tampón TBS (ver Anexo I) con Tween[®] 20 al 0.1 % (v/v; T-TBS) suplementado con gelatina al 20 % (v/v) antes de llevar a cabo la incubación con el anticuerpo primario. Tras el bloqueo, las membranas fueron incubadas durante 1h a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (1:1 000, Clon 4G10[®]; Millipore) en T-TBS. A continuación, fueron incubadas con el anticuerpo secundario (1:10 000, Anti-mouse, HRP-linked antibody; Sigma Aldrich) en T-TBS en las mismas condiciones descritas anteriormente. Para descartar la influencia de las posibles diferencias en la cantidad de proteínas extraídas, las membranas se reutilizaron (stripping) para su posterior incubación con el anticuerpo anti-tubulina. Para ello, con la intención de eliminar completamente las uniones de las proteínas adheridas a la membrana con el anticuerpo primario (anti-fosfotirosina) y secundario, la membrana se mantuvo durante 15 min en una solución (pH 6.5) compuesta de SDS al 2 % (p/v), 0.74 % (v/v) de b-mercaptoetanol, 62.5 mM Tris a 65 °C y en agitación. A continuación, las membranas fueron lavadas seis veces durante 5 min en T-TBS. Posteriormente, se realizó un bloqueo de los sitios no específicos de la membrana con leche al 5 % (p/v) en tampón T-TBS y las membranas fueron incubadas con el anticuerpo anti-tubulina (1:1 000, Clon B-5-1-2; Sigma Aldrich) en T-TBS con leche al 2 % (p/v) durante 2 h a temperatura ambiente y con el anticuerpo secundario (1:10 000, Anti-mouse, HRP-linked antibody; Sigma Aldrich) en T-TBS en las mismas condiciones.. Las membranas fueron reveladas mediante el C-DiGit Chemiluminescent Western Blot Scanner (LI-COR) y el posterior análisis de las imágenes digitalizadas se realizó utilizando el software Image Studio Lite V5 de Licor. La fosforilación fue evaluada mediante la cuantificación de la intensidad de señal de las bandas obtenidas por unidad de área. Para comparar los resultados obtenidos en cada tiempo de incubación, la señal de las bandas de proteínas fosforiladas se relativizó

a la señal de la tubulina, se cuantificó y normalizó considerando el control negativo (NCAP) como valor unitario.

14. *Análisis estadístico*

Los datos obtenidos (media \pm error estándar de la media (EEM)) fueron analizados con el programa SPSS 24.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). La normalidad de los datos fue verificada por una prueba Kolmogorov-Smirnov. Cuando fue necesario, los datos se transformaron en arcoseno. Se realizaron 4 réplicas de cada experimento.

Se llevó a cabo un ANOVA factorial para evaluar el efecto diferentes concentraciones de BSA sobre los diferentes parámetros espermáticos, considerando como efectos fijos cada uno de los tratamientos y la réplica. Se consideró que existieron diferencias significativas para el factor a estudiar cuando $P < 0.05$. Cuando el ANOVA reveló un efecto significativo, los valores fueron comparados por el test de Bonferroni.

Resultados

Parámetros de motilidad de los espermatozoides descongelados de ciervo Ibérico incubados con diferentes concentraciones de BSA

Los espermatozoides incubados con los medios suplementados con las diferentes concentraciones de BSA no mostraron diferencias significativas en relación a las muestras espermáticas capacitadas y no capacitadas para ninguno de los parámetros de motilidad espermática evaluados (Figura 1). Sin embargo, el porcentaje de espermatozoides móviles disminuyó ($P < 0.05$) con 10 mg mL⁻¹ de BSA respecto al control negativo (NCAP) (Figura 1 a).

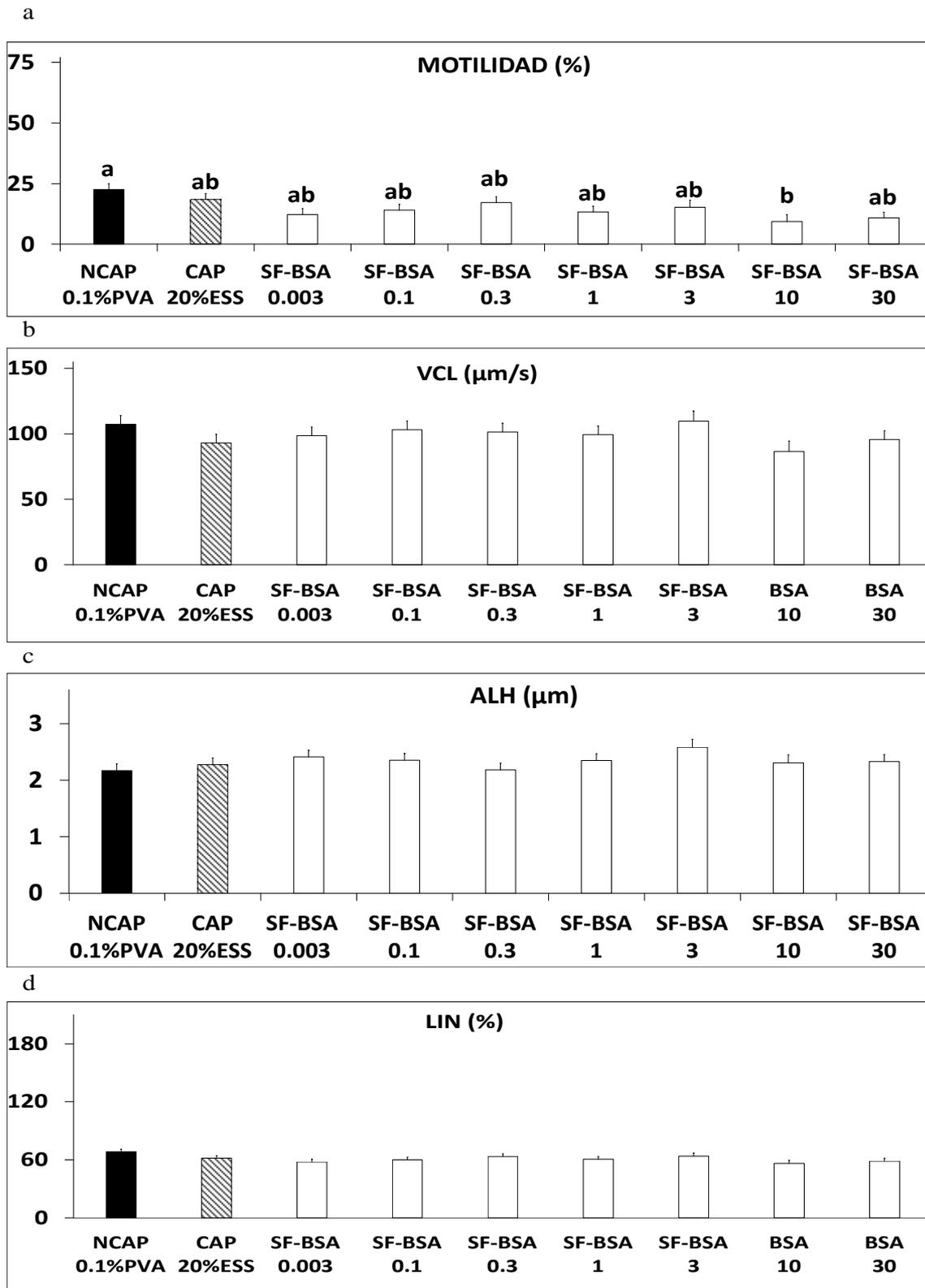


Figura 1. Efecto de diferentes concentraciones de BSA en el medio de capacitación (SF-BSA) sobre parámetros de motilidad espermática de muestras criopreservadas de ciervo: (a) MT (%): motilidad total; (b) VCL ($\mu\text{m/s}$): velocidad curvilínea; (c) ALH (μm): amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide; (d) LIN (%): índice de linealidad. Valores con distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes medios. Las barras representan la media \pm EEM.

Parámetros evaluados mediante citometría de flujo de los espermatozoides descongelados de ciervo Ibérico incubados con diferentes concentraciones de BSA

Como observamos en la Figura 2 a y 2 b, la viabilidad espermática y la actividad mitocondrial disminuyeron respecto a ambos controles (CAP y NCAP) ($P < 0.05$) cuando la concentración de BSA fue de 3, 10 y 30 mg mL⁻¹

Por su parte, los niveles de ROS fueron significativamente inferiores cuando los espermatozoides fueron incubados en los medios formulados con ESS y con concentraciones de BSA superiores a 0.1 mg mL⁻¹ en relación al NCAP y a la concentración 0.003 mg mL⁻¹ de BSA (Figura 2 c).

El porcentaje de espermatozoides viables con acrosomas dañados disminuyó ($P < 0.05$) en medios suplementados con concentraciones superiores a 0.1 mg mL⁻¹ de BSA en relación a las muestras capacitadas, aunque no existieron diferencias significativas en relación a las muestras no capacitadas (Figura 2 d).

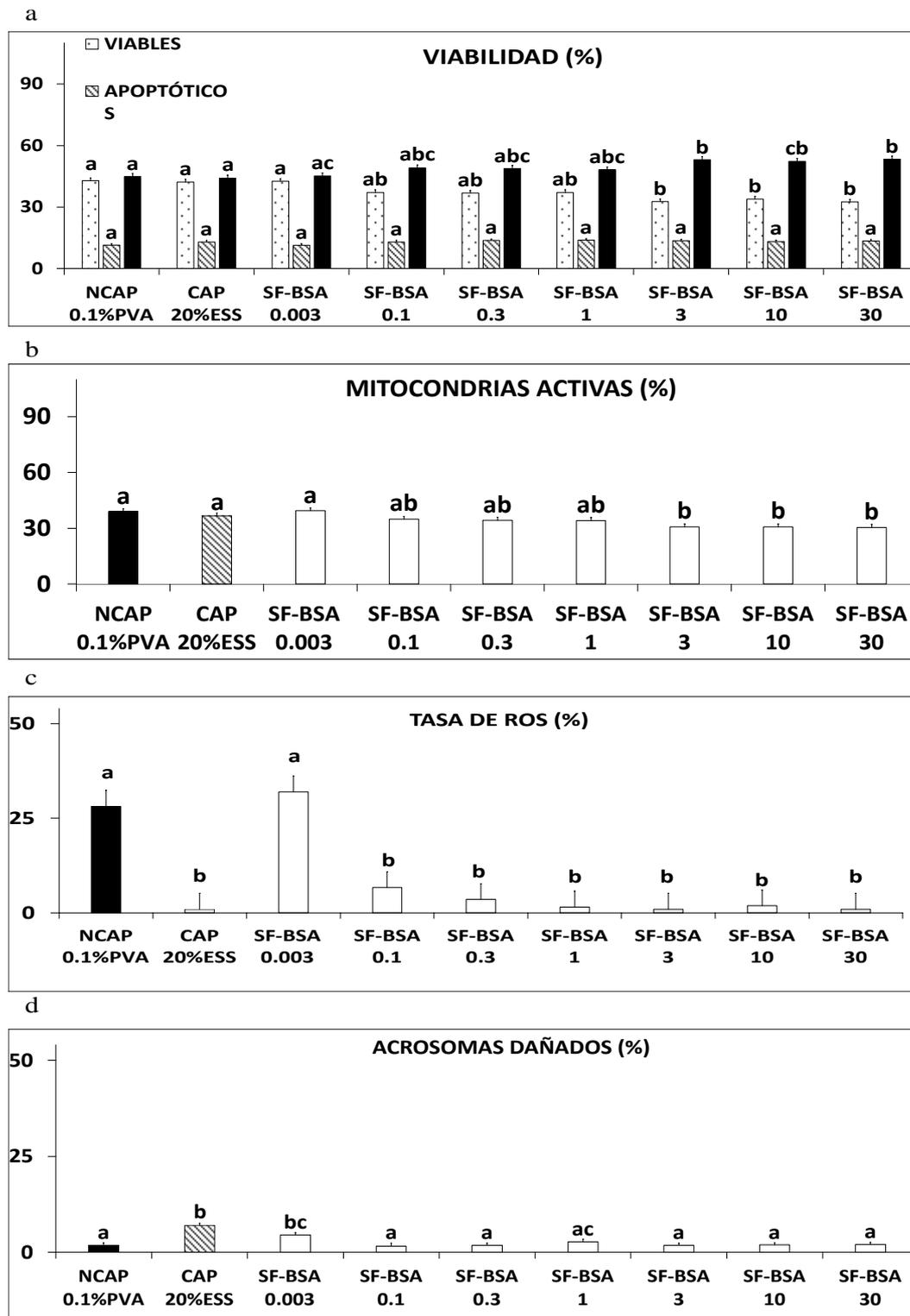


Figura 2. Efecto de diferentes concentraciones de BSA en el medio de capacitación (SF-BSA) sobre parámetros espermáticos analizados por citometría de flujo de muestras criopreservadas de ciervo: (a) Porcentaje de espermatozoides viables, apoptóticos y no viables; (b) Porcentaje de espermatozoides viables con mitocondrias activas; (c) Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) de la población de espermatozoides viables; (d) Porcentaje de espermatozoides viables con acrosomas intactos. Valores con distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes medios. Las barras representan la media \pm EEM.

Fosforilación de los residuos tirosina de los espermatozoides descongelados de ciervo Ibérico incubados con diferentes concentraciones de BSA

No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la intensidad de fosforilación en tirosina para espermatozoides incubados en los diferentes medios adicionados con BSA y las muestras capacitadas y no capacitadas, aunque sí existieron diferencias ($P < 0.05$) entre estos 2 tratamientos (Figura 3).

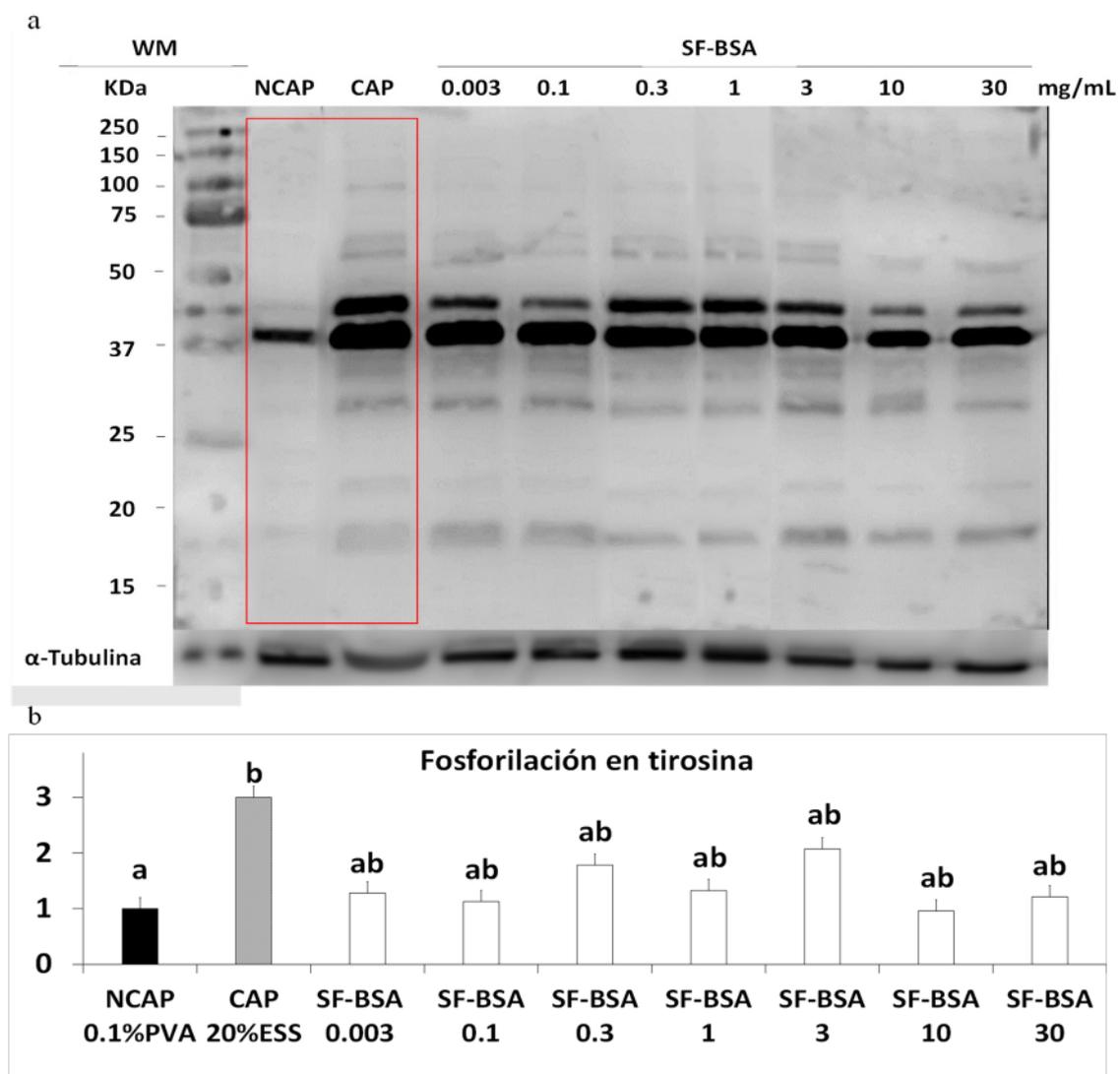


Figura 3. Fosforilación de proteínas en residuos de tirosina de espermatozoides descongelados de ciervo tras la incubación en diferentes concentraciones de BSA. (a) Imagen representativa de una membrana del análisis de Western-Blot. (b) Resultados obtenidos tras la cuantificación de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina normalizada al NCAP. Valores con distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes medios. Las barras representan la media \pm EEM de los valores normalizados al control negativo.

Discusión

En nuestro estudio observamos que la BSA, una de las sustancias habitualmente empleada en diferentes especies de mamíferos (ovino [82], ratón [36]; cerdo [180]) para estimular la capacitación espermática, no fue capaz de inducir una adecuada respuesta a la CIV en espermatozoides descongelados de ciervo.

La albúmina es la proteína más abundante del suero y representa una alternativa adecuada a ésta sustancia en los medios de cultivo celular al ejercer un efecto similar [184]. Así, la BSA ha sido utilizada en los medios de capacitación de espermatozoides de morueco y cerdo, por su capacidad para eliminar el colesterol de la MP [82,180]. La salida de colesterol es uno de los eventos clave en la capacitación relacionado con el incremento de la fosforilación de proteínas que resulta de la estimulación de la vía de señalización del AMPc por parte del calcio y bicarbonato también presentes en los medios [35]. Además, la BSA ejerce un efecto antioxidante y regulador osmótico [184] que favorece el desarrollo normal de la capacitación.

Nuestros resultados muestran que la BSA proporcionaron a los espermatozoides unas condiciones comparables a las del ESS en la mayoría de los parámetros evaluados. Así, los parámetros cinemáticos evaluados, los niveles de ROS o la fosforilación en tirosina mostraron valores similares a los del ESS, siendo incluso inferior el porcentaje de espermatozoides viables con acrosomas dañados cuando la BSA sustituyó al ESS en concentraciones superiores a 0.003 mg mL^{-1} . No obstante, aunque concentraciones de BSA inferiores a 3 mg mL^{-1} ejercieron un efecto semejante al del ESS sobre el porcentaje de espermatozoides motiles, viables y con mitocondrias activas, superar esa concentración conllevó la reducción de la viabilidad y la actividad mitocondrial, así como la concentración de 10 mg mL^{-1} la disminución de la motilidad. Estos resultados pudieron tener su origen en que concentraciones de BSA superiores a 3 mg mL^{-1} aumentarían

ligeramente la presión osmótica del medio, como ha sido previamente demostrado en medios de incubación de espermatozoides de bovino [185]. Si bien la presencia de BSA favoreció la homeostasis celular [184,185], su uso en concentraciones altas ($\geq 4 \text{ mg mL}^{-1}$) también produjo la reducción de la viabilidad por estrés osmótico [185], lo que en nuestro estudio pudo suponer el descenso en la motilidad y actividad mitocondrial. No obstante, la reducción observada en nuestro estudio no fue acompañada de ningún otro de los parámetros evaluado, y los parámetros cinemáticos, los niveles de ROS o la fosforilación en tirosina de las muestras incubadas con concentraciones de BSA superiores a 3 mg mL^{-1} mostraron valores similares a los del ESS, así como menores porcentajes de espermatozoides viables con acrosomas dañados. En relación a estos último, los resultados sugieren que la BSA como alternativa al ESS podría reducir los eventos de reacción acrosómica espontánea que se producen con el uso de ESS durante la inducción de la CIV [99]. Concentraciones de BSA igual a 3 mg mL^{-1} y superiores son empleados en medios de CIV en la mayoría de las especies, así como para otras etapas de la PIVE como el cultivo *in vitro* de los embriones [10,50,56,186].

Por otra parte, todas las concentraciones de BSA evaluadas, excepto la menor (0.003 mg mL^{-1}), mantuvieron bajos los niveles de ROS de los espermatozoides, neutralizándolos de manera similar al ESS. Bajo nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que confirma el efecto antioxidante de la BSA en espermatozoides de ciervo. La ausencia de ESS o BSA (NCAP), así como una concentración pequeña de la misma (0.003 mg mL^{-1}), provocó que los niveles de ROS intracelular fueran mayores que en el resto de los medios evaluados. Estos resultados indican que el uso de bajas concentraciones de BSA (en el rango de 0.003 mg mL^{-1}) no aseguran la correcta neutralización de las ROS, lo que pudo favorecer el daño en el acrosoma observado con la concentración 0.003 mg mL^{-1} de BSA [187]. Si bien, el deterioro producido por niveles altos de ROS está

relacionado la peroxidación de los lípidos de la MP espermática lo que reduce su viabilidad y motilidad [188], en nuestro estudio el daño del acrosoma no fue acompañado por cambios en los porcentajes de estos dos parámetros. No obstante, estudios previos en ciervos han demostrado que existen niveles de peroxidación compatibles con una viabilidad y motilidad íntegra, pero capaces de provocar daños en otras estructuras espermáticas como los acrosomas [189,190].

En relación con la fosforilación en residuos de tirosina, nuestros resultados mostraron que las diferentes concentraciones de BSA generaron una respuesta similar a los espermatozoides capacitados con ESS (CAP). Estos resultados resultan prometedores, pues los efectos de la BSA en diferentes especies varían enormemente, llegando incluso a ser capaz de inhibir los eventos de fosforilación durante la capacitación de espermatozoides de caballo bajo condiciones similares a las aquí propuestas [90]. Además, en nuestro estudio, no existieron diferencias entre los valores de fosforilación entre los diferentes tratamientos con BSA y el control negativo (NCAP), pero sí entre este último y el CAP. Esto parece indicar que la respuesta de los espermatozoides tras la adición de BSA no fue completamente similar a las muestras capacitadas, al presentar valores similares al control positivo y negativo. De acuerdo con nuestro estudio, previamente en ciervo se ha observado que el efecto del ESS en relación a la promoción de los eventos de fosforilación fue superior a la observada con cualquiera de las concentraciones de BSA que evaluaron [50]. Sin embargo, a diferencia de lo obtenido en nuestro estudio, estos autores reportaron un aumento en este parámetro con el uso de concentraciones altas de BSA (6 y 10 mg mL⁻¹). La capacidad de la BSA para eliminar el colesterol que promueve la posterior fosforilación de tirosina se debe a la presencia de una proteína de transferencia de lípidos I (LTP-I) cuya actividad podría verse disminuida por los procesos de purificación a los que se someten las BSA comerciales [191]. Es

probable que, en nuestro estudio, este sea el motivo por el que los espermatozoides de ciervos incubados con BSA mostraron valores intermedios en fosforilación en tirosina en relación al CAP y NCAP.

Estudios previos sobre CIV en otra especie de pequeño rumiantes como el ovino han demostrado que, sin el uso de ESS, únicamente es posible inducir una correcta respuesta a la capacitación cuando los espermatozoides son incubados en un medio donde el AMPc se mantiene en niveles altos [82,117,192,193]. Aunque nuestros resultados no nos permiten confirmar esta hipótesis, es posible que, de manera similar al ovino, el punto crítico en la inducción de la capacitación esté en la correcta elevación de los niveles de AMPc, o bien se encuentre a nivel de la activación de la PKA. Futuros estudios destinados a la mejora de los medios de capacitación sin la presencia de ESS deberían considerar evaluar el efecto de otros componentes esenciales en el proceso como el calcio y el bicarbonato [194,195], así como la suplementación de los medios con sustancias capaces de mantener elevado los niveles de AMPc.

CAPÍTULO IV

Evaluación de la concentración de calcio, bicarbonato y efecto del pH sobre la funcionalidad y capacitación espermática en espermatozoides descongelados de ciervo Ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*)

Resumen

A pesar de que una apropiada inducción a la capacitación espermática es un requisito fundamental para la producción *in vitro* de embriones (PIVE), hasta la fecha, no se ha desarrollado ningún medio definido que permita capacitar *in vitro* con éxito los espermatozoides de ciervo. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de un SOF formulado con diferentes concentraciones de calcio (0, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 y 5 mM) y bicarbonato (0, 1, 5, 10, 15, 20, 30 mM), así como diferentes valores de pH (5, 6, 7, 8 y 9) sobre la funcionalidad y capacitación espermática de espermatozoides de ciervo descongelado. Además, se utilizó un control positivo formado por SOF con ESS (CAP) y un control negativo por SOF con PVA (NCAP). En relación a los parámetros de movilidad (Motilidad, VCL, LIN, ALH) no existieron diferencias entre las diferentes concentraciones de calcio y los controles. Por otra parte, una ausencia de Ca^{2+} en el medio produjo un mayor porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañados en relación al medio CAP y el NCAP (31.61 ± 4.83 vs. 6.27 ± 4.83 y 5.08 ± 4.83 %, respectivamente). Además, el desorden de fosfolípidos de MP aumentó para las concentraciones 0.03, 0.1, 0.3 y 3 mM de Ca^{2+} (95.21 ± 2.16 , 96.21 ± 2.16 , 94.59 ± 2.16 y 95.59 ± 2.16 %) en relación al CAP y NCAP (82.33 ± 2.16 y 82.57 ± 2.16 %), aunque la fosforilación en tirosina fue mayor solamente para la concentración de 3 mM en relación al CAP y NCAP (8.78 ± 1.13 vs. 3.68 ± 1.13 y 1 ± 1.13 unidades (uds), respectivamente) Por otra parte, las diferentes concentraciones de bicarbonato no influyeron sobre los parámetros de movilidad ni sobre el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma dañado en relación a los controles. Sin embargo, el porcentaje de espermatozoides con desorden de fosfolípidos de MP aumentó tanto en las muestras sin bicarbonato, así como con las diferentes concentraciones de bicarbonato en relación al CAP y NCAP. Además, la concentración de 30 mM (4.70 ± 1.59 uds) así como el medio sin bicarbonato (1.79 ± 1.59 uds), incrementaron la fosforilación

de tirosina en relación a los controles (CAP: 1.79 ± 1.59 y NCAP: 1 ± 1.59 uds). Finalmente, un pH igual a 5 disminuyó la VCL ($25.35 \pm 5.99 \mu\text{m s}^{-1}$) y la LIN ($41.72 \pm 3.66 \%$) en relación al CAP (VCL: $72.24 \pm 5.99 \mu\text{m s}^{-1}$; LIN: $60.79 \pm 3.66 \%$) y NCAP (VCL: $77.66 \pm 5.99 \mu\text{m s}^{-1}$; LIN: $68.15 \pm 3.66 \%$) y los pHs de 8 y 9 disminuyeron el desorden de fosfolípidos de MP (75.59 ± 4.05 y 21.56 ± 4.05 , respectivamente) y la fosforilación en tirosina (X e Y, respectivamente) en relación con el medio CAP.

Introducción

Los espermatozoides de mamíferos tras la eyaculación no son capaces de fecundar el ovocito [39]. Esta capacidad es adquirida en el tracto reproductor femenino donde experimentan un proceso denominado capacitación espermática [38,94]. Durante este proceso, ocurren en el espermatozoide cambios bioquímicos y biofísicos [196] rápidos, como la activación de la motilidad y la modificación de la MP, los cuales comienzan cuando los espermatozoides se exponen a concentraciones variables de Ca^{2+} y de HCO_3^- del plasma seminal y del tracto reproductivo de la hembra [182]. Otros cambios, sin embargo, ocurren de forma más tardía cuando el espermatozoide contacta con el fluido oviductal, como la adquisición del movimiento de hiperactivación y la reacción acrosómica (RA), siendo todos ellos claves para que el espermatozoide pueda penetrar el ovocito [43].

Numerosos estudios se han centrado en la identificación de las vías de señalización celular que regulan la capacitación espermática en mamíferos [197]. Uno de los modelos propuestos [80] sitúa al metabolismo del AMPc como eje central de todos los eventos moleculares relacionados con la capacitación, el cual es activado por la entrada al espermatozoide de Ca^{2+} y HCO_3^- . Ambos iones actúan sobre el enzima adenil ciclasa (sAC) [86,198] que incrementa los niveles de AMPc, activa la proteína Kinasa A (PKA) y desencadena la fosforilación de residuos de tirosina de numerosas proteínas [87]. Además, con la activación de esta cascada de señalización se produce la formación de agregados lipídicos sobre la zona apical de la MP de la cabeza del espermatozoides y la eliminación posterior del colesterol por sustancias como la albúmina sérica [199,200]. Por su parte, el movimiento a través de la MP del HCO_3^- da lugar a la alcalinización del pH intracelular [201,202] que favorece el incremento de la concentración del Ca^{2+} intracelular y la estimulación también de la vía de señalización del AMPc [91,203,204].

La activación de la vía del AMPc/PKA a través de la incubación de espermatozoides en medios sintéticos formulados con albúmina, Ca^{2+} y HCO_3^- , ha hecho posible la CIV (CIV) en numerosas especies [35]. Hasta la fecha, no se han realizado trabajos orientados a identificar qué concentración de estos componentes y qué condiciones de pH son más adecuadas para la CIV de espermatozoides de ciervo. Como consecuencia, para capacitar los espermatozoides de ciervo en ensayos de FIV los medios de capacitación son extrapolados de otras especies, lo que probablemente esté contribuyendo a los bajos rendimientos obtenidos y a la variabilidad de los resultados [8,92,135]. Así, mientras que en algunos trabajos en ciervo se ha utilizado un SOF [141] con una alta concentración de Ca^{2+} (5 mM) y de HCO_3^- (25 mM) y un pH aproximado de 7.4 [31,75,205], otros optan por emplear una concentración de Ca^{2+} más reducida (2 mM)[76,133] o directamente eliminarlo sin especificar la cantidad de HCO_3^- ni las condiciones de pH [77,206]. Además, de estos pocos trabajos no podemos concluir qué composición es la más adecuada pues es habitual la suplementación con ESS [7], lo que altera de manera impredecible la concentración final de estos componentes, ya que el ESS presenta en su composición cantidades variables de Ca^{2+} y HCO_3^- [55]. Asimismo, debido a la capacidad del ESS para amortiguar el pH del medio [184], se desconoce si distintos pHs durante la CIV ejercen algún efecto sobre los espermatozoides.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue diseñar un medio definido sin ESS (SF-CAP), evaluando para ello el efecto de diferentes concentraciones de Ca^{2+} , HCO_3^- y distintos pH sobre la CIV de espermatozoides descongelados de ciervo. Además, se evaluó si el SF-CAP podría representar una alternativa viable que sustituyera a los medios suplementados con ESS en esta especie mediante su uso en un ensayo de FIV.

Materiales y métodos.

15. Reactivos

Salvo que se indique lo contrario todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Madrid, España). Los fluorocromos fueron obtenidos de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, USA) y el aceite mineral de NidOil™ (Nidacon International, Suecia).

16. Recogida y criopreservación espermática

Las muestras espermáticas procedieron del Banco de Germoplasma de la Universidad de Castilla-La Mancha (UCLM). Se utilizaron dosis de 3 machos adultos (> 2 años de edad) de ciervo Ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*) cuyos eyaculados fueron congelados entre los años 2000 y 2005. Todos los protocolos experimentales relacionados con el manejo de los animales siguieron la Regulación Española de Protección RD 1201/2005 conforme a la Regulación de la Unión Europea 2003/65. Los eyaculados fueron obtenidos durante la época reproductiva (mediados del mes de septiembre) mediante electroeyaculación como ha sido descrito previamente en esta especie [138]. Los ciervos fueron inmovilizados y anestesiados con una inyección intravenosa de xilacina (0.75 mg kg⁻¹; Rompun®; Bayer AG, Leverkusen, Alemania) y ketamina (1.5 mg kg⁻¹; Imalgene 1000®; Rhone-Mérieux, Lyon, Francia). Las heces fueron retiradas del recto y la zona del prepucio fue lavada con solución salina fisiológica (ver Anexo I). La electroeyaculación fue llevada a cabo utilizando una sonda con una longitud de 375 mm y una anchura de 40 mm; la longitud de los electrodos fue de 80 mm. La sonda estuvo conectada a una fuente que permitió controlar tanto el voltaje como el amperaje. La eyaculación de los animales ocurrió a unos valores medios de 4.5 V y 90 mA (el tiempo medio registrado hasta la eyaculación fue de 3 min). La anestesia fue revertida con clorhidrato de yohimbina (0.3 mg kg⁻¹; preparado al 0.9 %; Sigma, Madrid, España).

El eyaculado fue recogido en fracciones en tubos graduados atemperados. La presencia de orina fue analizada en cada fracción de eyaculado recogido mediante tiras reactivas de urea (Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Alemania), siendo descartadas las fracciones contaminadas. Las fracciones de eyaculado con una motilidad masal (0-5) inferior a 4 también fueron descartadas. El resto de las fracciones del eyaculado fueron mezcladas y mantenidas en un baño térmico con solución salina fisiológica (ver Anexo I) a 30 °C hasta su congelación que se realizó siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

El semen fue diluido hasta una concentración final de $200 \cdot 10^6$ espermatozoides mL^{-1} en un diluyente Triladyl® (Minitüb, Tiefenbach, Alemania) suplementado con 20 % (v/v) de yema de huevo. Las muestras diluidas fueron enfriadas lentamente (desde 37 °C a 5 °C) durante 90 min y mantenidas a 5 °C durante 2 h. Tras este período, las muestras fueron envasadas en pajuelas de 0.25 mL (Minitüb, Tiefenbach, Alemania) y congeladas en vapores de nitrógeno (a una altura de 4 cm sobre el nivel de nitrógeno líquido) durante 10 min como ha sido descrito [139]. Posteriormente, las pajuelas fueron sumergidas en nitrógeno líquido, donde permanecieron almacenadas hasta su utilización.

17. *Diseño experimental*

Para establecer la concentración de Ca^{2+} , NaHCO_3 y el pH del medio SF-CAP se desarrolló una serie de tres experimentos consecutivos seleccionando en cada uno de ellos aquellas concentraciones de los diferentes compuestos y pH que mejores resultados proporcionaron en relación con aquellos parámetros espermáticos asociados a la CIV (Figura 1).

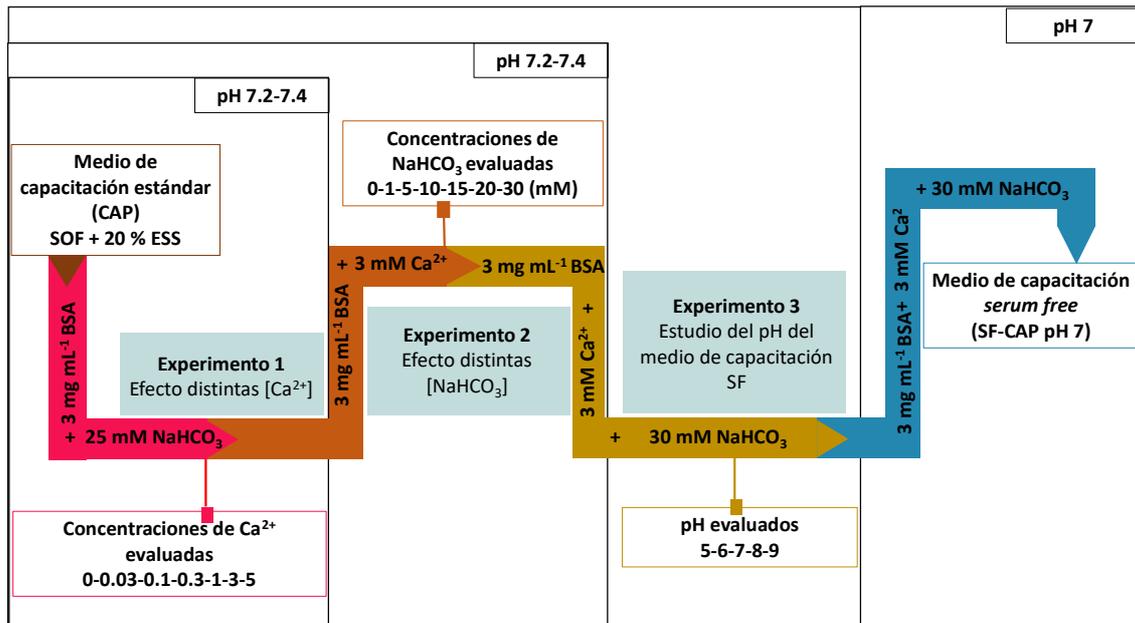


Figura 1. Diseño experimental.

Para cada experimento se descongelaron y procesaron conjuntamente muestras espermáticas de tres ciervos adultos. La descongelación de las pajuelas se realizó mediante inmersión en un baño térmico con solución salina fisiológica a 37 °C durante 30 s. A continuación, se realizó una centrifugación en un gradiente de diferente densidad de Percoll® (45 %/90 %) a 700 g durante 10 min con el objetivo de eliminar el plasma seminal, el diluyente de congelación y aumentar la proporción de espermatozoides viables, seleccionando aquellos que presentaban una motilidad adecuada [207]. Tras la centrifugación, el sobrenadante fue retirado y los espermatozoides fueron diluidos hasta una concentración de 10^6 espermatozoides mL^{-1} en los diferentes medios de capacitación a evaluar (composición descrita en la Tabla 1) según el experimento:

- Experimento 1: efecto de la concentración de Ca^{2+} (medio SF- Ca^{2+}) sobre la funcionalidad y capacitación espermática. Se evaluaron las siguientes concentraciones de Ca^{2+} : 0, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 y 5 mM.

- Experimento 2: efecto de la concentración de HCO_3^- (medio SF-Bic) sobre la funcionalidad y capacitación espermática. Se evaluaron las siguientes concentraciones de NaHCO_3 : 0, 1, 5, 10, 15, 20 y 30 mM.
- Experimento 3: efecto de diferentes pH (medio SF-pH) sobre la funcionalidad y capacitación espermática. Se evaluaron los siguientes pHs: 5, 6, 7, 8 y 9.

En todos los experimentos se utilizó como medio base un SOF [141] ligeramente modificado (mSOF; Ver Anexo I) suplementado con BSA (3 mg mL^{-1}). Como control positivo los espermatozoides fueron diluidos en mSOF al que se le añadió 20 % (v/v) de ESS (CAP), y como control negativo los espermatozoides fueron diluidos mSOF suplementado con 0.1 % (p/v) de PVA (NCAP). Ambos controles fueron elaborados sin BSA. Para preservar las condiciones de pH en todos los experimentos los medios fueron enriquecidos con HEPES (2.35 mg mL^{-1}). Dado a que fue imposible ajustar la cantidad de CO_2 para cada una de las concentraciones de HCO_3^- propuestas, las incubaciones fueron realizadas fuera de incubadores. Los diferentes parámetros fueron evaluados a los 15 min, por ser el tiempo en el que mayor proporción de espermatozoides desarrollaron las modificaciones asociadas a la capacitación y mayor capacidad fecundante mostraron (ver Capítulo II de esta Tesis Doctoral). Cada uno de los tres experimentos se replicó cuatro veces.

Por último, una vez definido el medio en el que los espermatozoides manifestaron aquellas características compatibles con la capacitación (SF-CAP pH 7) se llevó a cabo un test de FIV con ovocitos de cierva. Como control positivo se utilizaron muestras espermáticas diluidas en medio CAP e incubadas durante 15 min con un 5% CO_2 a 38.5 °C. El test de FIV fue replicado tres veces.

Tabla 1. Composición del medio de capacitación estándar (CAP), del medio utilizado como control negativo (NCAP) y de los diferentes medios de capacitación SF en estudio (mM).

Medios estudio	CaCl₂		NaHCO₃		pH
SF-Ca²⁺	0-0.03-0.1-0.3-1-3-5		25		7.2-7.4
SF-Bic	3		0-1-5-10-15-20- 30		7.2-7.4
SF-pH	3		30		5-6-7-8-9
Componentes basales	NCAP	CAP	SF-Ca	SF-Bic	SF-pH
NaCl	108	108	108	108	108
KCl	7.16	7.16	7.16	7.16	7.16
KH ₂ PO ₄	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Na lactato ^a	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3
Piruvato	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Glutamina	1	1	1	1	1
Penicilina	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Rojo fenol (mgmL ⁻¹)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Suplementos					
% ESS (v:v)	-	20	-	-	-
% PVA (p:v)	0.1	-	-	-	-
HEPES (mg mL ⁻¹)	2.35	2.35	2.35	2.35	2.35
pH	7.2-7.4	7.2-7.4	7.2-7.4	7.2-7.4	i.f.
MOsm	270-280	270-280	270-280	270-280	270-280

^a: ρ lactato=1.33 g mL⁻¹.

i.f.: incluido en la formulación.

18. Evaluación de parámetros de motilidad espermática objetiva

La motilidad objetiva de los espermatozoides tras la incubación en los medios bajo estudio fue evaluada mediante el software Sperm Class Analyzer (SCA[®], Microptic 2002) como se ha descrito previamente para muestras de ciervo [144]. Se capturaron, al menos, 10 campos por muestra espermática utilizando una cámara Basler A302 fs digital (Basler Vision Technologies, Ahrensburg, Alemania) acoplada a un ordenador mediante un conector IEEE 1394. El tamaño de las imágenes fue de 768 x 576 píxeles. La velocidad de adquisición fue de 50 imágenes s⁻¹ y el tamaño de la cabeza de los espermatozoides se limitó a un área comprendida entre 20-90 μm². Para cada muestra, se registraron los siguientes parámetros: motilidad, definida como porcentaje de espermatozoides con una

velocidad $> 10 \mu\text{m s}^{-1}$ según la trayectoria curvilínea; velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m s}^{-1}$), calculada a partir de la distancia total recorrida por la cabeza del espermatozoide en toda su trayectoria; índice de linealidad (LIN, %), definido como relación porcentual entre la velocidad rectilínea (calculada a partir de la distancia en línea recta recorrida por la cabeza del espermatozoide desde el primer punto hasta el último punto de su trayectoria) y la VCL; y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza de los espermatozoides (ALH; μm), que se corresponde con el valor medio de la amplitud que describe la cabeza del espermatozoide en cada batido.

19. *Análisis de parámetros espermáticos evaluados mediante citometría de flujo*

Debido al número de muestras tan amplio y a la gran batería de parámetros evaluados en cada uno de los experimentos, se utilizaron dos citómetros de flujo simultáneamente para evitar que los diferentes análisis espermáticos se solaparan.

El desorden de fosfolípidos de la MP fue evaluado mediante un citómetro FC500 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) equipado con el software MXP (v.3), mientras que la integridad del acrosoma fue evaluada mediante un citómetro Cell Lab Quanta SC (Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.) junto con el software Cell Lab Quanta SC Analysis. Los datos obtenidos fueron analizados con el software WEASEL (WEHI, Melbourne, Australia). En todas las evaluaciones se analizaron 10 000 eventos por muestra espermática. Todos los fluorocromos fueron excitados con un láser de 488 nm. En el citómetro FC 500, la fluorescencia verde emitida por el fluorocromo YO-PRO[®]-1 recogida por el fotodetector FL-1 (filtro 530/28B); la fluorescencia naranja emitida por la Merocianina 540 por el fotodetector FL-2 (filtro 575/26BP); la fluorescencia roja emitida por el IP por el fotodetector FL-3 (620/40BP). En el citómetro Cell Lab Quanta SC, la fluorescencia verde emitida por el fluorocromo FITC fue detectada por el fotodetector

FL-1 (filtro 510-540/BP) y la fluorescencia roja emitida por el IP por el fotodetector FL-3 (filtro 670/LP).

Para eliminar cualquier otro tipo de células diferente de la población principal de espermatozoides, se utilizó, en el citómetro FC500, un gráfico de puntos de la dispersión de la luz frontal vs. lateral y, en el citómetro Cell Lab Quanta SC, un gráfico de puntos de la dispersión de la luz lateral vs. el volumen electrónico de las células.

Las muestras espermáticas fueron diluidas hasta una concentración de 1×10^6 espermatozoides mL^{-1} en las diferentes soluciones de tinción (descritas a continuación) preparadas en un medio SOF (ver Anexo I) suplementado con 0.1 % (p/v) de PVA y HEPES (2.35 mg mL^{-1}).

Para la evaluación de la viabilidad espermática se utilizó la combinación de los fluorocromos yoduro de propidio (IP; $12 \mu\text{M}$ (stock: 7.5 mM en agua desionizada)) y YO-PRO[®]-1 (50 nM (stock: 1 mM en DMSO)). La población de espermatozoides IP-/YO-PRO-1- fue considerada como espermatozoides viables; la población IP-/YO-PRO-1+ como espermatozoides apoptóticos; y la población IP+/YO-PRO-1+ fue considerada como espermatozoides no viables (muertos).

La integridad del acrosoma se evaluó mediante la combinación de los fluorocromos PNA-FITC ($3 \mu\text{g mL}^{-1}$ (stock: $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de agua desionizada) e IP ($12 \mu\text{M}$ (stock: 7.5 mM en agua desionizada)). La población de espermatozoides PNA-FITC-/IP- fue considerada como espermatozoides viables con acrosomas intactos.

La evaluación del desorden de fosfolípidos fue realizada mediante la combinación de los fluorocromos Merocianina 540 (1 mM (stock: 3.4 mM en DMSO)) y YO-PRO[®]-1 (50 nM (stock: 1 mM en DMSO)). La población de espermatozoides Merocianina 540+ fue considerada como espermatozoides con un mayor desorden de fosfolípidos de la MP y fue calculada dentro de la población de espermatozoides viables (YO-PRO-1-).

20. Análisis de la fosforilación de los residuos de tirosina

La fosforilación en tirosina de proteínas fue analizada mediante Western-Blot en las muestras espermáticas diluidas en los distintos medios tras la incubación de 15 min. Tras la dilución, las proteínas fueron extraídas como había sido descrito previamente [111]. Tras añadir b-mercaptoetanol al 5 %, las muestras espermáticas se llevaron a ebullición durante 3 min. Los extractos de proteínas procedentes de $5 \cdot 10^6$ de espermatozoides se cargaron en geles de poliacrilamida (8 % (v/v)) y se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE. Las proteínas se sometieron a electro-transferencia en membranas de PVDF (Bio-Rad) a 250 mA durante 120 min a 5 °C. Los sitios no específicos de las membranas se bloquearon durante 1 h en un tampón TBS (ver Anexo I) con Tween[®] 20 al 0.1 % (v/v; T-TBS) suplementado con gelatina al 20 % (v/v) antes de llevar a cabo la incubación con el anticuerpo primario. Tras el bloqueo, las membranas fueron incubadas durante 1h a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (1:1 000, Clon 4G10[®]; Millipore) en T-TBS. A continuación, fueron incubadas con el anticuerpo secundario (1:10 000, Anti-mouse, HRP-linked antibody; Sigma Aldrich) en T-TBS en las mismas condiciones descritas anteriormente. Para descartar la influencia de las posibles diferencias en la cantidad de proteínas extraídas, las membranas se reutilizaron (stripping) para su posterior incubación con el anticuerpo anti-tubulina. Para ello, con la intención de eliminar completamente las uniones de las proteínas adheridas a la membrana con el anticuerpo primario (anti-fosfotirosina) y secundario, la membrana se mantuvo durante 15 min en una solución (pH 6.5) compuesta de SDS al 2 % (p/v), 0.74 % (v/v) de b-mercaptoetanol, 62.5 mM Tris a 65 °C y en agitación. A continuación, las membranas fueron lavadas seis veces durante 5 min en T-TBS. Posteriormente, se realizó un bloqueo de los sitios no específicos de la membrana con leche al 5 % (p/v) en tampón T-TBS y las membranas fueron incubadas con el anticuerpo anti-tubulina (1:1 000, Clon

B-5-1-2; Sigma Aldrich) en T-TBS con leche al 2 % (p/v) durante 2 h a temperatura ambiente y con el anticuerpo secundario (1:10 000, Anti-mouse, HRP-linked antibody; Sigma Aldrich) en T-TBS en las mismas condiciones. Las membranas fueron reveladas mediante el C-DiGit Chemiluminescent Western Blot Scanner (LI-COR) y el posterior análisis de las imágenes digitalizadas utilizando el software Image Studio Lite V5 de Licor. Para comparar los resultados obtenidos en cada tiempo de incubación, las bandas de proteínas correspondientes a la fosforilación en tirosina se relativizaron a la señal de la tubulina, se cuantificaron y normalizaron considerando el control negativo (NCAP) a los 0 min como valor unitario. El análisis de fosforilación en tirosina de proteínas de cada uno de los cuatro experimentos evaluados fue replicado cuatro veces.

21. *Test de fecundación in vitro*

Tras evaluar el efecto de la concentración de Ca^{2+} y NaHCO_3 y de diversos pHs, se seleccionó el medio con el que los espermatozoides de ciervo manifestaron un comportamiento compatible con la capacitación (SF-CAP pH 7) y se llevó a cabo un test de FIV utilizando ovocitos de ciervas. Para ello, ovarios procedentes de ciervas adultas sacrificadas en descastes realizados en el Parque Nacional de Cabañeros fueron recogidos y transportados al laboratorio en una solución salina (ver Anexo I) suplementada con 0.28 mM de penicilina a 30 °C. Los CCOs fueron obtenidos de los folículos tras realizar cortes en el ovario con la hoja de un bisturí depositando el contenido en un medio 199 (M4530) suplementado con HEPES (11.56 mM), heparina ($2 \mu\text{L mL}^{-1}$) y gentamicina ($4 \mu\text{L mL}^{-1}$), previamente equilibrado (5 % CO_2 a 38.5 °C).

Una vez obtenidos los COCs, estos fueron madurados *in vitro* como describió [208] en medio 199 suplementado con cisteamina (100 μM), FSH y LH (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), FCS (10 %) y gentamicina (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) en 5 % CO_2 a 38.5 °C. Tras 24 h, las células del cúmulus fueron eliminadas suavemente utilizando una pipeta. El medio utilizado para

lavar los ovocitos y realizar el co-cultivo con los espermatozoides fue un SOF [141] (ver Anexo I). Posteriormente, los ovocitos ($n = 366$) fueron depositados en placas de 4 pocillos con 450 μL de SOF suplementado con PVA (0.1 % (p/v)).

Los espermatozoides descongelados de tres ciervos fueron mezclados y seleccionados mediante centrifugación en un gradiente de diferente densidad de Percoll[®] (45 %/90 %) a 700 g durante 10 min. El sobrenadante fue retirado y el pellet diluido en medio CAP, medio NCAP y en el medio SF-CAP pH 7 hasta una concentración de 10^6 espermatozoides mL^{-1} . La incubación de todas las muestras espermáticas fue llevada a cabo durante 15 min en un 5 % de CO_2 a 38.5 °C.

Seguidamente, se realizó la co-incubación de los espermatozoides con los ovocitos en medio NCAP, depositando para ello $1 \cdot 10^6$ espermatozoides mL^{-1} por pocillo durante 18 h en un 5 % de CO_2 , 5 % de O_2 y 90 % de N_2 a 38.5 °C. El porcentaje de ovocitos divididos (tasa de división) fue evaluado a las 48 h post-inseminación (h.p.i.) mediante estereomicroscopio (Nikon SMZ 1500) y fue expresado respecto al número total de ovocitos. El test de FIV fue replicado tres veces.

22. *Análisis estadístico*

Los datos obtenidos (media \pm error estándar de la media (EEM)) fueron analizados con el programa SPSS 24.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). La normalidad de los datos fue verificada por una prueba Kolmogorov-Smirnov. Cuando fue necesario, los datos se transformaron en arcoseno. Se realizaron 4 réplicas de cada experimento y 3 réplicas del test de FIV.

Se llevó a cabo un ANOVA factorial para evaluar el efecto del tiempo de incubación en condiciones de CIV sobre los diferentes parámetros espermáticos, considerando como efectos fijos los diferentes medios analizados y la réplica. Se consideró que existieron

diferencias significativas para el factor a estudiar cuando $P < 0.05$. Cuando el ANOVA reveló un efecto significativo, los valores fueron comparados por el test de Bonferroni.

Resultados

Experimento 1. Efecto de la concentración de Ca^{2+} en el medio de CIV sobre la funcionalidad y capacitación de espermatozoides descongelados de ciervo Ibérico

Para los parámetros de motilidad espermática (Figura 2), no se observaron diferencias significativas entre los distintos medios con Ca^{2+} respecto a ambos controles (NCAP y CAP). Sin embargo, al comparar estos parámetros entre las distintas concentraciones de Ca^{2+} estudiadas, encontramos que cuando los espermatozoides fueron incubados en el medio SF-Ca 1 mM la VCL fue significativamente mayor respecto a aquellos incubados en el medio SF-Ca 0 mM (Figura 2b). De manera similar, los espermatozoides incubados en el medio SF-Ca 1 mM presentaron un LIN superior ($p < 0.005$) que aquellos incubados en el medio SF-Ca 0.1 mM (Figura 2c).

En relación al porcentaje de espermatozoides con acrosomas dañados no existieron diferencias significativas en relación al CAP y NCAP para aquellos medios suplementados con calcio, independientemente de la concentración utilizada, aunque el porcentaje de espermatozoides dañados fue mayor cuando el calcio no estuvo presente en el medio (SF-Ca 0 mM; Figura 3a).

En relación con el aumento del desorden de fosfolípidos de la MP (Figura 3b), observamos que todas las concentraciones de Ca^{2+} evaluadas promovieron un aumento significativo de este parámetro respecto a los controles (CAP y NCAP) a excepción de 0, 1 y 5 mM. Por su parte, la concentración de 5 mM produjo un menor desorden de fosfolípidos ($P < 0.05$) que las comprendidas entre 0.03 y 0.3 mM y que la concentración de 3 mM.

La fosforilación de tirosina fue significativamente mayor cuando los espermatozoides fueron incubados en el medio formulado con 3 mM de Ca^{2+} en comparación con los controles y con el resto de los medios evaluados a excepción de los medios formulados en ausencia de Ca^{2+} y con 1 mM (Figura 3c). Además, la Fosforilación en tirosina fue superior en el medio al que no se le añadió Ca^{2+} respecto al control negativo (NCAP; $P < 0.05$). El resto de los medios evaluados no mostraron diferencias significativas entre ellos ni respecto a los controles.

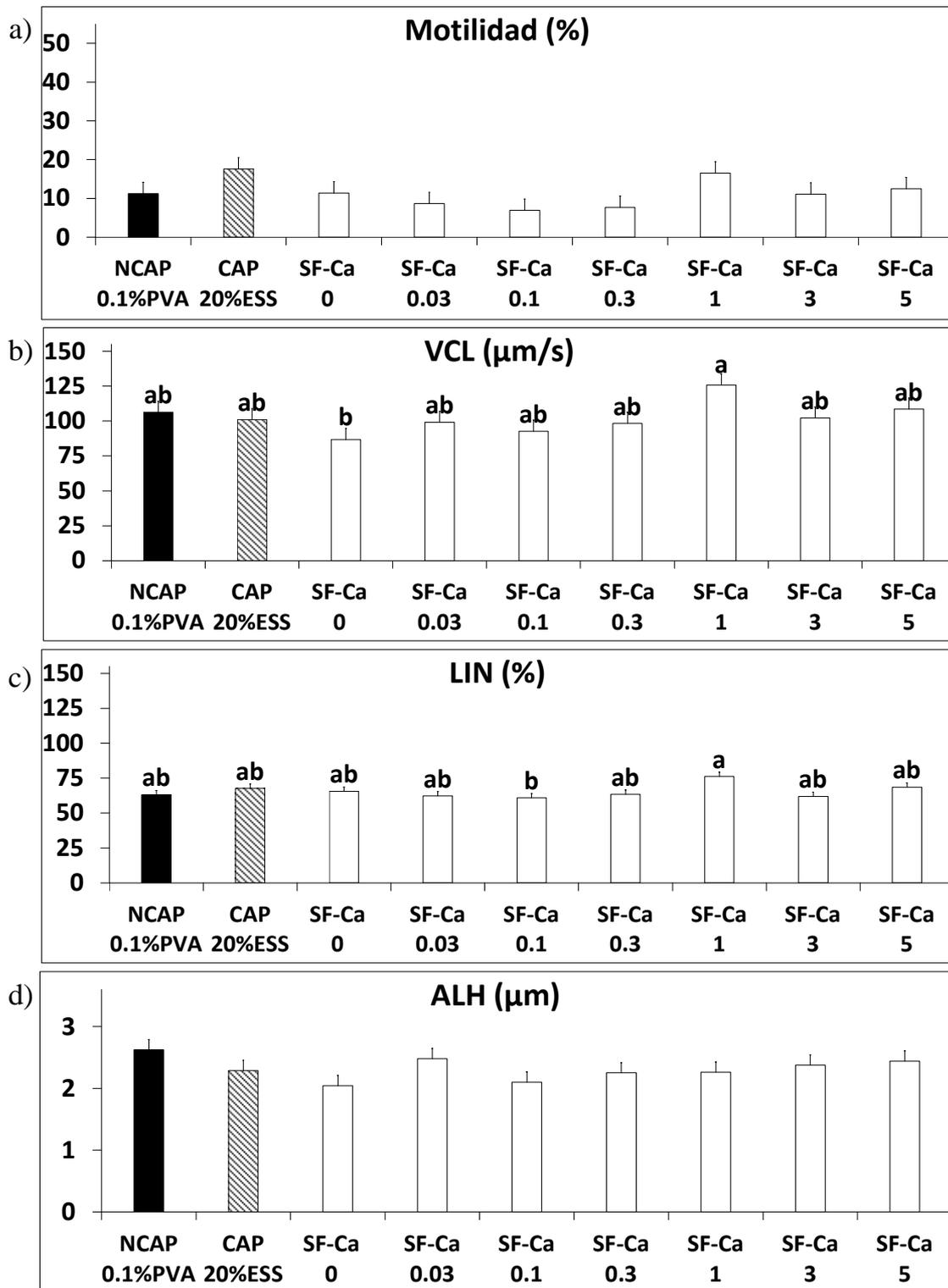


Figura 2. Efecto de la concentración de Ca^{2+} en el medio de capacitación (SF-Ca) sobre parámetros de motilidad espermática: a) motilidad: porcentaje de espermatozoides motiles; b) VCL: velocidad curvilínea; c) LIN: índice de linealidad; d) ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide. Distintos superíndices indican diferencias significativas entre medios. Las barras representan la media \pm EEM.

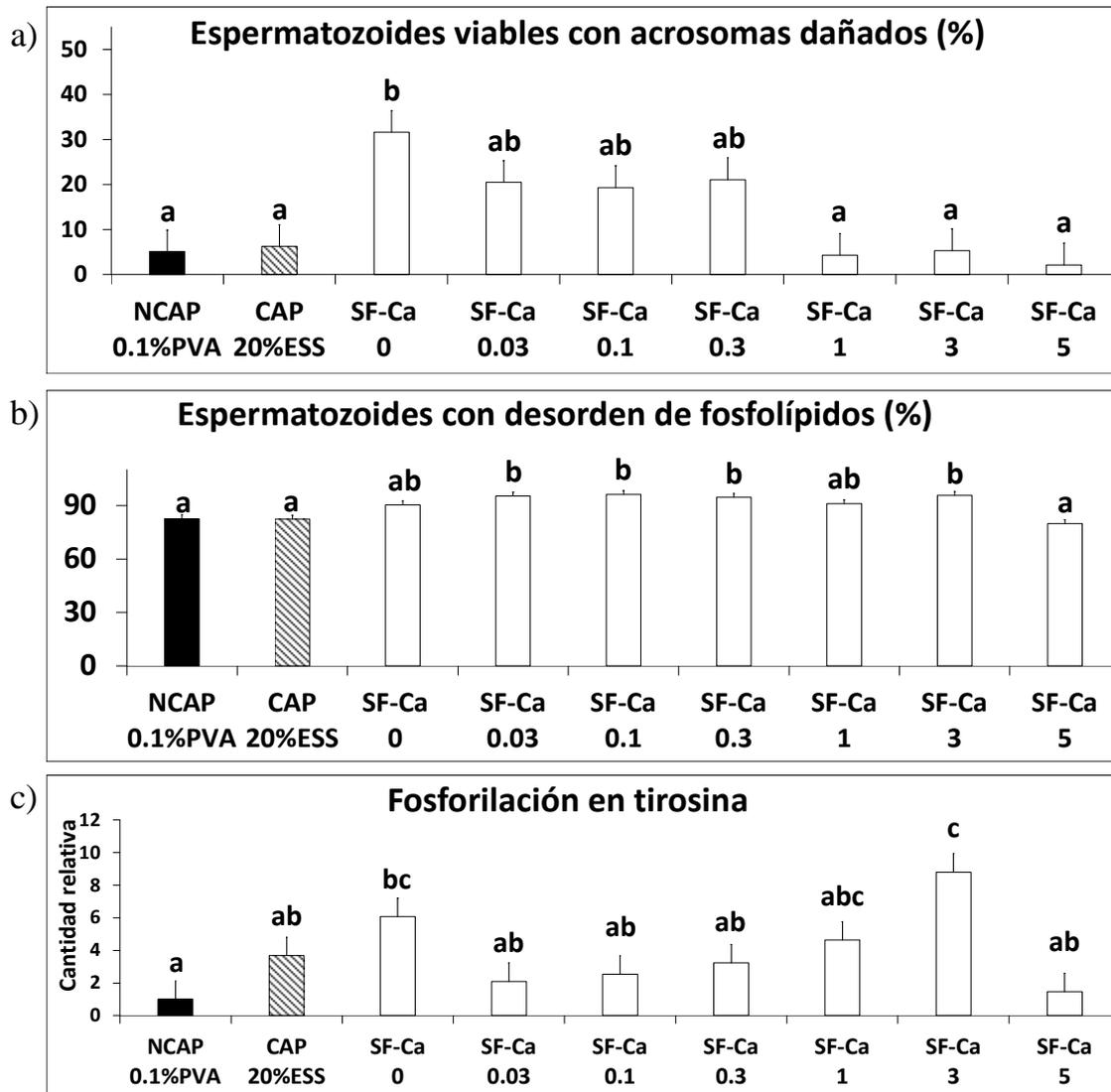


Figura 3. Efecto de la concentración de Ca²⁺ en el medio de capacitación (SF-Ca) sobre parámetros espermáticos: (a) porcentaje de espermatozoides viables con acrosomas dañados; (b) porcentaje de espermatozoides con desorden de fosfolípidos de la MP dentro de la población viable; (c) valores de fosforilación en tirosina. Distintos superíndices indican diferencias significativas entre medios. Las barras representan la media ± EEM.

Experimento 2. Efecto de las concentraciones de bicarbonato en el medio de CIV sobre la funcionalidad y capacitación de espermatozoides descongelados de ciervo Ibérico

Tras la evaluación de los parámetros de motilidad espermática, solamente se observaron diferencias significativas para la LIN, siendo mayor ($P < 0.05$) para la concentración de NaHCO₃ de 10 mM respecto al medio formulado sin bicarbonato (SF-Bic 0 mM; Figura 4). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los valores de LIN cuando

comparamos los medios con diferentes concentraciones de bicarbonato respecto al CAP y NCAP (Figura 4c).

El estado del acrosoma no se vio afectado por las diferentes concentraciones de bicarbonato estudiadas ($P > 0.05$; Figura 5a).

Tampoco se encontraron diferencias para el desorden de fosfolípidos entre las diferentes concentraciones de bicarbonato evaluadas ($P < 0.05$), aunque fueron en todos los casos significativamente mayores respecto a ambos controles (Figura 5b).

Por último, las concentraciones de 0 y 30 mM de bicarbonato aumentaron significativamente la fosforilación en tirosina respecto a los tratamientos control ($P < 0.05$; Figura 5c).

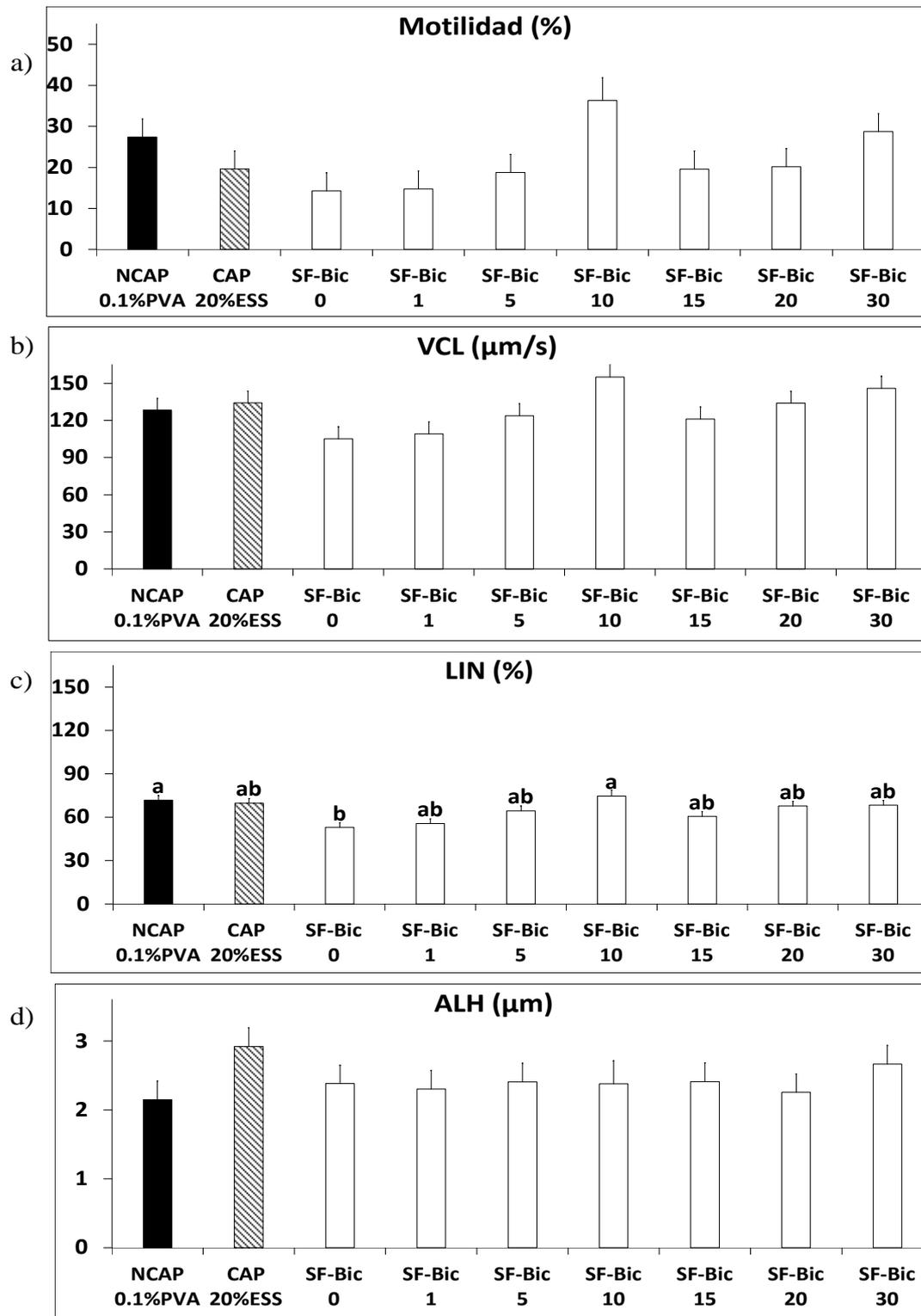


Figura 4. Efecto de la concentración de bicarbonato en el medio de capacitación (SF-Bic) sobre parámetros de motilidad espermática: a) motilidad: porcentaje de espermatozoides motiles; b) VCL: velocidad curvilínea; c) LIN: índice de linealidad; d) ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide. Distintos superíndices indican diferencias significativas entre medios. Las barras representan la media ± EEM.

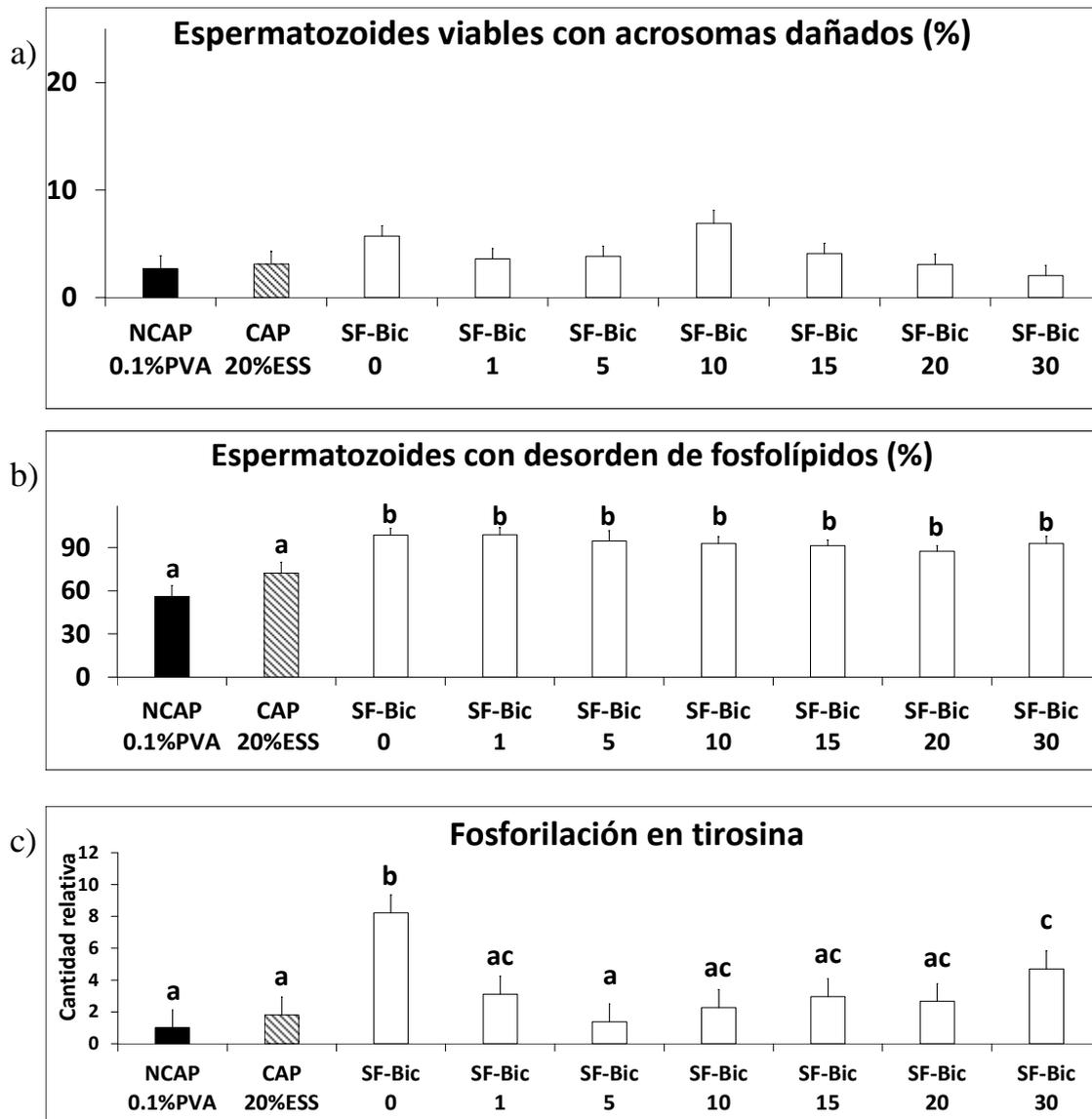


Figura 5. Efecto de la concentración de bicarbonato en el medio de capacitación (SF-Bic) sobre parámetros espermáticos: (a) porcentaje de espermatozoides viables con acrosomas dañados; (b) porcentaje de espermatozoides con desorden de fosfolípidos de la MP dentro de la población viable; (c) valores de fosforilación en tirosina. Distintos superíndices indican diferencias significativas entre medios. Las barras representan la media \pm EEM.

Experimento 3. Efecto del pH en el medio de CIV definido sobre la funcionalidad y capacitación de espermatozoides descongelados de ciervo Ibérico

La incubación de las muestras espermáticas en medios con diferentes valores de pH no afectó a los parámetros de motilidad y ALH. Además, los espermatozoides incubados en

medios con pHs 6, 7 y 8, no mostraron diferencias significativas para la VCL y LIN y además el pH de 9 para la LIN en relación al CAP y NCAP (Figura 6).

No observamos diferencias significativas entre los medios formulados con diferentes pHs y el CAP y NCAP para el porcentaje de espermatozoides vivos con el acrosoma dañado (Figura 7a).

Por su parte, el desorden de fosfolípidos de MP de los espermatozoides incubados en medios con pHs 5, 6 y 7 fue similar en relación al CAP y NCAP. Sin embargo, cuando fueron incubados en un medio con un pH 8 y 9, el desorden de fosfolípidos de la MP fue significativamente menor respecto al medio CAP y al NCAP para el caso de pH 9 (Figura 7b).

Como observamos en la Figura 7c, la incubación de los espermatozoides en SF-pH 6 y 7 aumentó la Fosforilación en tirosina ($P < 0.05$) respecto al NCAP. Sin embargo, estos dos medios no mostraron diferencias significativas en relación al CAP.

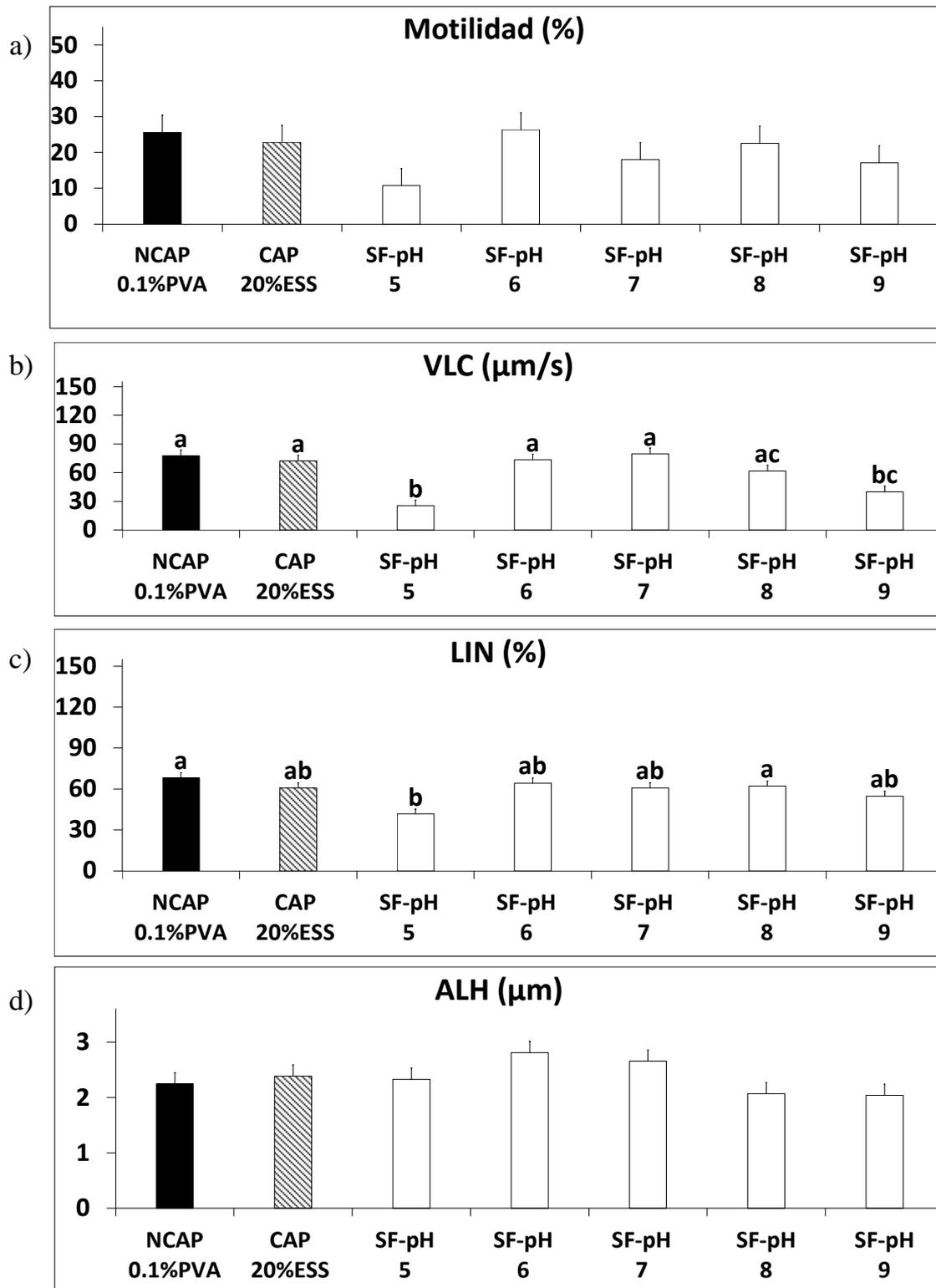


Figura 6. Efecto del pH del medio de capacitación (SF-pH) sobre parámetros de motilidad espermática: a) motilidad: porcentaje de espermatozoides motiles; b) VLC: velocidad curvilínea; c) LIN: índice de linealidad; d) ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide. Distintos superíndices indican diferencias significativas entre medios. Las barras representan la media \pm EEM.

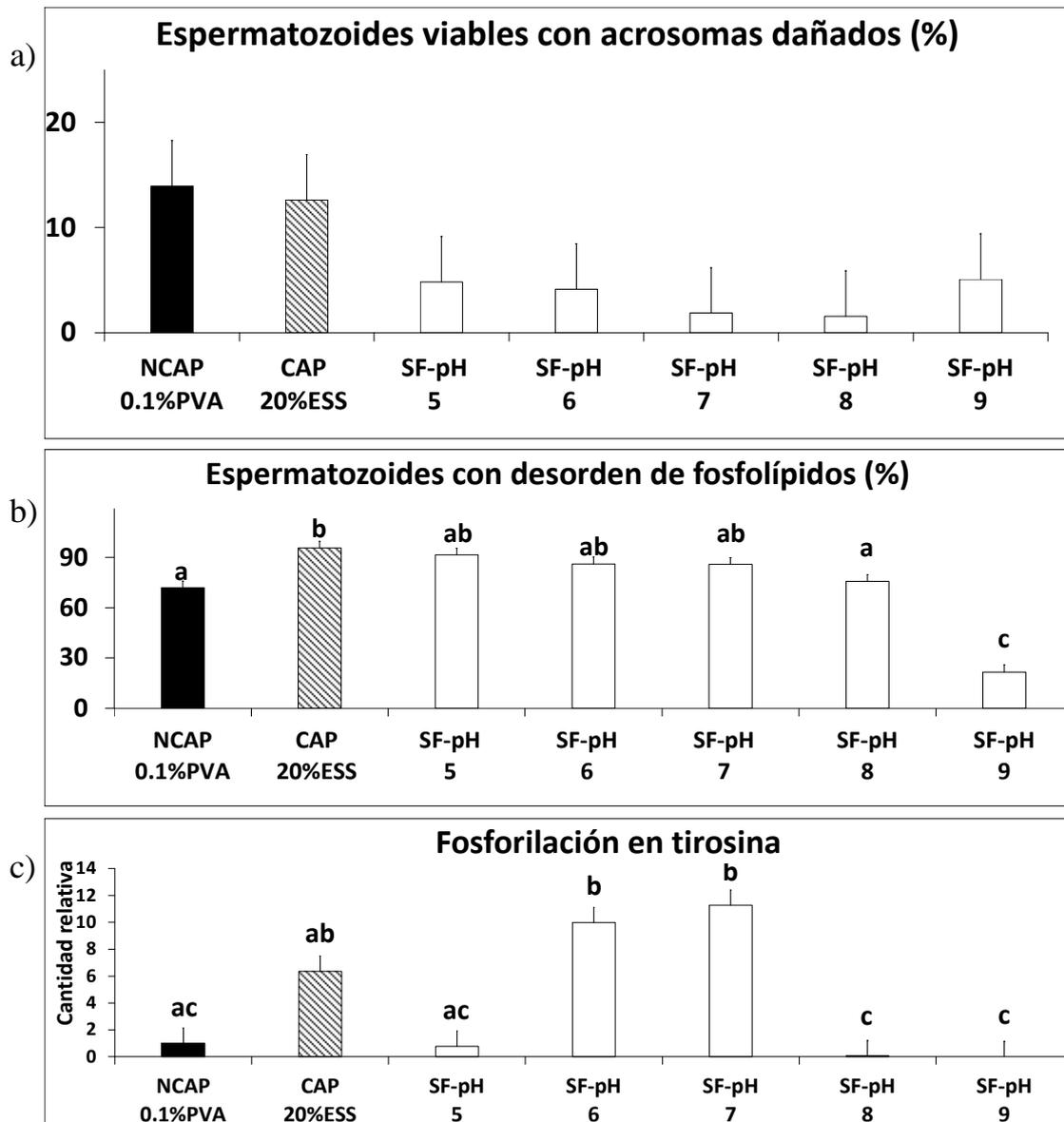


Figura 7. Efecto del pH del medio de capacitación (SF-pH) sobre parámetros espermáticos: (a) porcentaje de espermatozoides viables con acrosomas dañados; (b) porcentaje de espermatozoides con desorden de fosfolípidos de membrana dentro de la población viable; (c) valores de fosforilación en tirosina. Distintos superíndices indican diferencias significativas entre medios. Las barras representan la media \pm EEM.

Fecundación in vitro

La incubación de los espermatozoides durante 15 min en medio SF-CAP con un pH 7 produjo tasas de división a las 48 h.p.i. significativamente más bajas ($P < 0.05$) que las obtenidas con el medio CAP (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de embriones a las 48 h.p.i tras la incubación de los espermatozoides en medio SF-CAP y CAP.

Medio de incubación de los espermatozoides	SF-CAP	CAP
Tasa de división a las 48 h.p.i. (%)	6 ± 5.1^b	28 ± 4.3^a

Los datos son medias \pm EEM. Valores con diferentes superíndices indican diferencias significativas entre medias.

Discusión

El objetivo de este estudio fue diseñar un medio de CIV eficiente para espermatozoides de ciervo Ibérico para optimiza la PIVE en esta especie. Comparado con otros mamíferos, los espermatozoides de ciervo son difíciles de capacitar *in vitro* [181] y, hasta la fecha, es imprescindible la suplementación con ESS de los medios utilizados. En este trabajo, por primera vez, se demuestra que es posible promover modificaciones asociadas a la capacitación espermática (incremento del desorden de fosfolípidos y de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina) en ciervo, sin la adición de ESS mediante la correcta definición de la concentración de componentes fundamentales en este proceso como el Ca^{2+} (3 mM) y el bicarbonato (30 mM), así como de las condiciones de pH (7). Este medio de capacitación definido ofrece una alternativa a los medios tradicionales (con ESS) y supone un primer paso para reducir la variabilidad obtenida con el uso de sustancias tan complejas como los sueros [56,103] en la PIVE de ciervos.

El papel del Ca^{2+} extracelular en la motilidad o en el desarrollo de la capacitación y RA, así como la posterior fecundación, está comúnmente aceptado [209]. No obstante, numerosos trabajos ponen de manifiesto que los mecanismos por los que el Ca^{2+} controla el proceso de CIV varían entre especies [36,119,179,210,211] y en ciervo, poco se conoce del efecto que distintas concentraciones de Ca^{2+} durante la CIV puedan ejercer sobre la funcionalidad espermática. En este trabajo, el porcentaje de espermatozoides motiles fue similar al medio de capacitación tradicional (CAP), independientemente de la concentración de Ca^{2+} . Estos resultados indican que, en ciervo, la concentración de Ca^{2+}

del medio de CIV no ejerce un efecto diferencial sobre el porcentaje de espermatozoides móviles, ni siquiera tras exposiciones largas (6 h) de elevadas concentraciones de Ca^{2+} (10 mM) [181]. Sin embargo, la ausencia o baja concentración de Ca^{2+} (0.1 mM) en el medio hizo que disminuyera la VCL y el LIN, respectivamente, en comparación al uso de concentraciones más altas (1 mM). En este sentido se ha visto que, durante la capacitación, la entrada de Ca^{2+} al espermatozoide es necesaria para elevar sus niveles intracelulares a valores suficientes para el mantenimiento de la motilidad, lo cual, si no ocurre, afecta negativamente a parámetros cinemáticos como la VCL y el ALH [212]. Además, en nuestro estudio la ausencia de Ca^{2+} en el medio favoreció el daño del acrosoma en la población de espermatozoides viables. Estos resultados ponen de manifiesto que el Ca^{2+} en los medios de CIV de ciervo es fundamental para mantener la funcionalidad de los espermatozoides en términos de motilidad e integridad acrosomal.

Respecto al uso de mayores concentraciones de Ca^{2+} (3 mM), nuestro trabajo demuestra que la incubación de los espermatozoides en el medio SF-Ca 3 mM provocó el incremento del desorden de fosfolípidos, así como de la fosforilación en tirosina. A nivel molecular, el papel del Ca^{2+} durante la CIV está relacionado con su capacidad para la redistribución lateral de los lípidos de la MP y con la modulación de la actividad de la enzima sAC, así como de diversas fosfodiesterasas, y la posterior fosforilación de proteínas [revisado por 7]. Si bien en estudios previos en esta especie ya habían demostrado que el uso de 3 mM de Ca^{2+} mejoraba las tasas de fecundación obtenidas respecto al uso de 1.5 y 5 mM de Ca^{2+} [8], nuestros resultados revelan además, como esta concentración promueve el incremento de estos dos eventos asociados a la capacitación, lo que podría justificar la mejora reportada en la FIV por estos investigadores. Además, nuestro trabajo muestra como incremento obtenido con el medio SF-Ca 3 mM fue significativamente superior a los valores alcanzados por los espermatozoides incubados

con ESS. Estos resultados indican que es posible prescindir del ESS para promover las modificaciones compatibles con la capacitación, lo que resulta prometedor para la estandarización de esta fase de la PIVE en esta especie. La importancia de la concentración de Ca^{2+} del medio de CIV para espermatozoides de ciervo es similar que la observada en morueco en lo que a la remodelación de la MP se refiere, pero por el contrario, en ovino, ésta parece no afectar a la fosforilación en tirosina [210]. Sin embargo, en ausencia de Ca^{2+} este proceso se inhibe en porcino [213]. Probablemente, los sistemas enzimáticos que controla el Ca^{2+} se vean afectados de manera diferente según la susceptibilidad de cada especie a la concentración de Ca^{2+} del medio.

El papel del bicarbonato en la funcionalidad espermática ha sido ampliamente descrito [revisado por 48], siendo un efector de la adquisición de la motilidad espermática después que estos abandonen el epidídimo [35]. En este sentido, en nuestro estudio, la motilidad se mantuvo en valores similares a los observados en los espermatozoides incubados en los medios control, incluso cuando el bicarbonato no fue incluido (SF-Bic 0 mM), esto último posiblemente debido a la presencia en el medio de Ca^{2+} (3 mM) o de lactato sódico los cuales participan en el mantenimiento de la motilidad espermática [215]. No obstante, nuestros resultados muestran que, en ausencia de bicarbonato, el LIN se reduce en comparación a cuando este compuesto está en el medio (1 mM) lo que indica un efecto sobre el mantenimiento del patrón de movimiento que las muestras espermáticas mostraron. Estos cambios en relación a la concentración de bicarbonato no fueron acompañados por una reducción de la integridad acrosomal y confirman la participación de este compuesto en el mantenimiento de la funcionalidad espermática.

En numerosas especies se ha reportado que el bicarbonato, además, es necesario para desencadenar las modificaciones de la MP [216], y la fosforilación en tirosina asociadas a la capacitación [36]. En este trabajo observamos que una concentración de

bicarbonato de 30 mM (SF-Bic 30) condujo al aumento del desorden de fosfolípidos de la MP y a los valores más altos de fosforilación en tirosina, superando los alcanzados por el medio capacitante (CAP). Sin embargo, emplearlo en concentraciones menores no desató dichos incrementos. De manera similar, cuando el fluido oviductal no alcanza valores del rango de 30 mM [217] debido a una secreción defectuosa, la capacitación espermática es deficiente y la fertilidad baja [218]. Nuestros resultados son consistentes con los observados en ovino [82], ratón [219] y humano [128] y, además, refrendan los obtenidos con el medio SF-Ca²⁺ 3 mM cuya concentración de bicarbonato era similar (25 mM). Este hecho, si bien podría ser esperable puesto que la composición de ambos (SF-Ca²⁺ 3 y SF-Bic 30) únicamente difería en 5 unidades mM de bicarbonato (ver Tabla 1), destaca el potencial del medio CIV definido por esta serie de experimentos y genera expectativas en relación a la reproducibilidad de estos resultados en futuros estudios.

Recientemente en porcino, se ha reportado que el bicarbonato parece ser innecesario para la CIV ya que la activación de la PKA, que es esencial para este proceso, así como la modificación de la MP, tienen lugar en medios formulados sin él [180]. Por su parte, en ovino, de manera similar, el incremento en fosforilación en tirosina tiene lugar independiente de que la concentración de Ca²⁺ sea 0 mM [210]. En nuestro estudio, la ausencia de ambos compuestos tampoco impidió este aumento. No obstante, en ausencia de Ca²⁺ en ciervo y de bicarbonato en porcino, la fecundación no es posible [8,220]. Previsiblemente, aunque las modificaciones compatibles con la capacitación fueran desarrolladas en ausencia de ambos compuestos, otros procesos imprescindibles para la fecundación del ovocito, como la RA, pueden verse comprometidos [39]. Sin embargo, nuestro trabajo no puede confirmar estos hechos y son necesarios más estudios que ayuden a la interpretación de estos resultados.

El efecto del pH del medio de CIV definido en esta serie de experimentos tuvo una gran importancia para que se desarrollaran las modificaciones a nivel de MP y de fosforilación de tirosina, al igual que se ha observado en espermatozoides de otras especies [90,91,221]. Así, a pesar de que el medio definido tras los experimentos del Ca^{2+} y del bicarbonato (SF-CAP; 3 mM Ca^{2+} ; 30 mM NaHCO_3) promoviese los cambios asociados a la capacitación, restringir o exceder los pHs 6 y 7 disminuyó de forma significativa el desorden de fosfolípidos, la fosforilación de tirosina y la VCL de los espermatozoides. La acidificación (pH 5) directa del pH_i a través del medio [41,222] ha sido asociada con una estimulación deficiente de la vía AMPc/PKA lo que resulta en la inhibición de la fosforilación de tirosina [91]. Por su parte, mientras que el aumento progresivo del pH_i es responsable del incremento de la fosforilación de tirosina, el uso de pH alcalinos desde el inicio de la incubación no permite este incremento [91]. Además, estudios previos han asociado la alcalinización del pH_i con un descenso del Ca^{2+} intracelular [223], lo que en nuestro caso pudo haber sido el origen de la disminución de la fosforilación en tirosina observada cuando el pH fue 8 y 9. Por su parte, el descenso de la VCL registrada con el uso de pH ácidos y alcalinos (5, 8 y 9) pudo estar relacionada con la incapacidad de los espermatozoides para mantener la homeostasis ácido-base [224] tal y como ha sido demostrado en ovino [221].

Según los experimentos realizados, la incubación de espermatozoides descongelados de ciervo en el medio SF-CAP con un pH 7 durante 15 min, promovió el incremento del desorden de fosfolípidos de la MP y de la fosforilación en tirosina asociados a la capacitación. A pesar de esto, cuando los espermatozoides fueron co-incubados con ovocitos de ciervas madurados *in vitro*, las tasas de división a las 48 h.p.i. fueron significativamente menores a las obtenidas bajo condiciones de capacitación y fecundación estándar (con ESS). En esta misma línea, otros autores han obtenido mejores

resultados cuando el medio de fecundación cubre las necesidades del ovocito y no se limita solamente a inducir la CIV [225]. Por lo tanto, nuestros resultados podrían indicar que los ovocitos de esta especie también necesitan la influencia de determinadas concentraciones de Ca^{2+} y bicarbonato en el medio, que deberán estudiarse en futuros estudios, para su adecuada fecundación.

DISCUSIÓN GENERAL

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) constituye una opción excelente para ser implementada en explotaciones ganaderas dedicadas a la cría del ciervo Ibérico por su enorme potencial. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta día de hoy están lejos de ser suficientemente buenos como para que los ganaderos puedan considerar su uso. La capacitación espermática es una de las fases que conforman esta TRA y abarca todos los cambios fisiológicos que experimentan los espermatozoides hasta adquirir la capacidad fecundante [80]. Este proceso se induce *in vitro* mediante la incubación de espermatozoides en medios que imitan el fluido oviductal [126]. En pequeños rumiantes, estos medios son suplementados con ESS por su capacidad para inducir la capacitación y la posterior fecundación de los ovocitos [7]. No obstante, el uso de ESS conlleva innumerables inconvenientes [54]. Uno de los más complejos está relacionado con la alta heterogeneidad de su composición y el fuerte componente genético que presenta [5-6], que hace que los resultados obtenidos tras su uso sean muy variables. Incluso el suero de una misma oveja obtenido en diferentes extracciones, presenta una composición diferente [55] pues factores como la época de recogida [103], la alimentación o el estado sanitario [55] en el momento de la recogida alteran la cantidad y diversidad de sus componentes.

Debido a lo mencionado anteriormente, en el primer capítulo de la presente Tesis Doctoral tuvimos como objetivo estudiar si el uso de dos sueros (ESS 1 y ESS 2) extraídos de diferentes ovejas durante el estro bajo los mismos procedimientos influye sobre la capacitación y parámetros funcionales espermáticos, así como sobre la producción y calidad embrionaria obtenida *in vitro*, tomando como modelo la especie ovina. Así, mediante este trabajo demostrábamos por primera vez que ESSs procedentes de distintas hembras modularon de manera diferente eventos clave que suceden durante la capacitación espermática como es la fosforilación en tirosina [35]. De los dos sueros evaluados, sólo el ESS 1 fue capaz de promover el incremento de la fosforilación en

tirosina de proteínas con pesos moleculares comprendidos entre 32-120 kDa, el cual ha sido previamente asociado a la CIV de espermatozoides de morueco [116,117]. En concreto, sólo los espermatozoides incubados con el ESS 1 mostraron un aumento en la fosforilación de proteínas de peso molecular de 32 kDa, el cual es considerado como una señal específica de la adquisición del estado capacitado en espermatozoides de morueco [116,117], pero también en otras como el porcino [227,228]. Por el contrario, el ESS 2 fue incapaz de mejorar los valores alcanzados con el medio no capacitante (NCAP). De manera similar, otros investigadores, en ciervo, otra especie de pequeños rumiantes, se observó que, mientras que el ESS estimula el incremento de fosforilación de tirosina asociado a la capacitación, el suero de cierva en celo fue incapaz de promoverlo [50]. Igualmente, la capacitación de espermatozoides de cerdo con sueros obtenidos de hembras en celo tratadas o no con ACTH, generó diferentes patrones de fosforilación en tirosina [102]. Una posible justificación al efecto diferencial de distintos ESSs sobre la fosforilación en tirosina podría estar fundamentada en la heterogeneidad de la composición de los sueros. Así, si bien en nuestro estudio ambos ESS fueron obtenidos en las mismas condiciones tras administrar un tratamiento idéntico de inducción al celo a las hembras, la variabilidad propia de cada individuo o una diferente respuesta al tratamiento podría estar influyendo en la composición del ESS.

Por el contrario, la producción embrionaria no se vio afectada por el uso de distintos sueros durante la fase de capacitación y FIV. Estos resultados contrastan con los obtenidos en porcino [102]. No obstante, es posible que las diferencias entre ambos trabajos fueran debidas a que en porcino los sueros utilizados procedían de cerdas distintos perfiles hormonales de los animales debidos a ser tratadas o no con ACTH [229], mientras que en nuestro caso las ovejas recibieron tratamientos hormonales semejantes.

De manera similar, la calidad embrionaria (en términos de expresión génica) obtenida tras el uso de ambos sueros no varió entre los dos grupos de embriones. Esta circunstancia pudo tener su origen en el hecho de que el tiempo de exposición al suero de los presuntos cigotos no fue lo suficientemente largo (18 h). Estudios previos han evidenciado como la fase de cultivo (8 días) es la que determina la calidad embrionaria [105,230], probablemente por ser la fase más larga de la PIVE y durante la que tienen lugar los eventos más importantes de desarrollo temprano del embrión [106]. No obstante, no se puede descartar que, las diferencias encontradas en expresión de los diferentes genes evaluados no fueran significativas como consecuencia del bajo número de embriones analizados. De hecho, se observó una tendencia hacia la mayor expresión de genes relacionados con estrés oxidativo (*SOD 2*), procesos apoptóticos (*BAX*), implantación y metabolismo (*AKR1B1*), factores de transcripción (*TP 53*) y uniones GAP (*GJA1*) con el uso del ESS 2 que con el ESS 1. Este hecho nos sugiere que posiblemente sea necesario incrementar el número de embriones evaluados, considerando además la opción de analizar los embriones y evaluando también parámetros de calidad de los presuntos cigotos en estadios distintos después de la fecundación.

Con los resultados obtenidos en el primer capítulo de esta Tesis Doctoral pudimos evidenciar las deficiencias de aquellos protocolos de CIV de los que el ESS forma parte y destacar la importancia de su eliminación de los medios empleados para tal fin. No obstante, en especies como el ciervo, en la que el ESS permite la capacitación y FIV [143], se desconoce cómo evoluciona la fisiología espermática a lo largo del proceso de capacitación. Esto hace que aspectos básicos como la duración de las incubaciones que permita que los espermatozoides capaciten todavía sea desconocido. Por lo tanto, era de especial interés llevar a cabo estudios que monitoricen diferentes características espermáticas que nos permitieran conocer la dinámica de la capacitación en

espermatozoides descongelados para poder utilizarlos en el momento óptimo sin que su funcionalidad se vea comprometidas.

Considerando lo anterior, el objetivo del segundo capítulo de esta Tesis Doctoral fue caracterizar los cambios que experimentan en el tiempo los espermatozoides descongelados de ciervo cuando son incubados en condiciones de capacitación, así como el impacto sobre su capacidad fecundante. Nuestros resultados confirmaron que sólo cuando el ESS estuvo presente en el medio (CAP), los espermatozoides de ciervo mostraron características compatibles con la capacitación (un aumento del desorden de fosfolípidos de la MP o de la fosforilación de proteínas), además de fecundar una mayor proporción de ovocitos. Además, incubaciones largas en condiciones de capacitación ($t > 30-45$ min) afectó negativamente a la motilidad, la viabilidad y la actividad mitocondrial, así como a los niveles de fosforilación de tirosina de los espermatozoides

Nuestros resultados mostraron que los espermatozoides experimentaron las modificaciones asociadas a la capacitación después de una incubación corta ($t < 30$ min). Este resultado estaría en línea con los observados previamente en especies como la ovina [52] o bovina [149] en relación a que la exposición de muestras descongeladas a los agentes capacitantes no requiere tiempos de incubación largos. Interesantemente, los resultados de fertilidad obtenidos mediante el test de FIV confirman que los espermatozoides son capaces de fecundar desde los primeros minutos de la incubación (5 min), y añaden que esta habilidad comienza a reducirse sobrepasados con incubaciones de 60 min. El compromiso de la capacidad fecundante de las muestras observado en las tasas de división obtenidas a las 48 h.p.i. pudo estar motivado por el deterioro que la funcionalidad espermática sufrió a partir de los 30-45 min de incubación como consecuencia del proceso de capacitación, tal y como ha sido descrito [45]. Esta reducción de la funcionalidad espermática observada podría tener su origen en la temprana (1 min)

desestabilización de la MP mediada por el ESS, la cual, con el tiempo pudo desencadenar el colapso de la misma lo que conllevó la reducción de la motilidad, la integridad acrosomal, de la actividad mitocondrial y de los eventos de fosforilación. No obstante, debe tenerse en cuenta también que durante la capacitación se necesita un requerimiento extra de energía [151–153], por lo que es posible que la reducción de la funcionalidad estuviera motivada por la incapacidad de mantener los niveles de metabolismo que requiere la capacitación durante un periodo de tiempo largo produciéndose el agotamiento de las mitocondrias y como consecuencia, de la motilidad, así como la reducción de la viabilidad y de los eventos de fosforilación por escasez de energía.

Durante la capacitación, mantener unos niveles de ROS en niveles que no sobrepasen la capacidad antioxidante del espermatozoide es crítico ya que procesos claves, como la fosforilación de tirosina no podrían tener lugar [156] pero sí, procesos de apoptosis celular [157]. Nuestros resultados mostraron el efecto antioxidante ejercido por el ESS a lo largo de la incubación en condiciones de capacitación, observando que mientras que estos no aumentaron hasta las 24 h de incubación en medio CAP, los niveles de ROS aumentaron significativamente tras 120 min de incubación en el medio NCAP.

En nuestro estudio, además, se identificaron diferentes patrones de fosforilación en tirosina en los espermatozoides a lo largo de la incubación en medio CAP observando que a tiempos cortos de incubación (< 30 min) la fosforilación tuvo lugar principalmente en la zona ecuatorial y acrosomal (Patrón IV) para posteriormente mostrarla sólo en la región acrosomal (Patrón III). Coincidiendo con el inicio de la disminución de la viabilidad (45 min) observamos una menor proporción de espermatozoides con fosforilación en la región ecuatorial (Patrones II y IV) de manera similar a lo que ocurre en espermatozoides descongelados de toro [161]. Previos estudios han asociado la

fosforilación en la cabeza espermática con eventos de fusión con el ovocito [169–171] en la especie humana [172], porcina [130] y bovina [231].

Por último, de manera similar que la evolución de los marcadores de capacitación y las tasas de división obtenidas tras la FIV, reportamos un incremento del grado de descondensación de la cromatina (%HDS) durante la primera parte de la incubación (< 30 min) en el medio de capacitación. Probablemente, este incremento del %HDS durante la capacitación prepare a la cromatina para su posterior remodelación tras la fecundación del ovocito para garantizar una correcta formación del pronúcleo masculino y del cigoto [232]. Este aumento del %HDS no fue paralelo a un aumento del índice de fragmentación del ADN, demostrando que nuestras condiciones de capacitación no provocaron daño en el ADN. Interesantemente, el %HDS, junto con el incremento de la fosforilación de los residuos de tirosina y la proporción de espermatozoides exhibiendo el Patrón IV mostraron una correlación positiva y significativa con las tasas de división de ovocitos a las 48 h.p.i.

Una vez identificado el tiempo de incubación necesario para que los espermatozoides experimentasen las modificaciones que la capacitación lleva asociadas, investigamos la manera de eliminar el ESS de los medios de CIV mediante el diseño de un medio en el que el ESS fue sustituido por BSA por ser una sustancia más definida [184]. El objetivo del tercer capítulo de esta Tesis Doctoral fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de BSA como agente capacitante para los espermatozoides descongelados de ciervo Ibérico.

La BSA ha sido utilizada en los medios de capacitación de espermatozoides de morueco, ratón y cerdo, por su capacidad para eliminar el colesterol de la MP plasmática [35,82,180]. La salida de colesterol es uno de los eventos clave en la capacitación [48] y está relacionado con el incremento de la fosforilación de proteínas que resulta de la

estimulación de la vía de señalización del AMPc por parte del calcio y bicarbonato, también presentes en los medios[46]. Además, la BSA ejerce un efecto antioxidante y regulador osmótico [184] que favorece el desarrollo normal de la capacitación.

Nuestros resultados muestran que la BSA proporcionaron a los espermatozoides unas condiciones comparables a las del ESS en la mayoría de los parámetros evaluados. Así, la motilidad, los niveles de ROS o la fosforilación en tirosina mostraron valores similares a los del ESS, siendo incluso inferior el porcentaje de espermatozoides viables con acrosomas dañados. No obstante, aunque concentraciones de BSA inferiores a 3 mg mL⁻¹ ejercieron un efecto semejante al del ESS sobre la viabilidad y la actividad mitocondrial, superar esa concentración conllevó la reducción de ambos parámetros. En este sentido, ha sido reportado que la adición de BSA en concentraciones altas (≥ 4 mg mL⁻¹) produce la reducción de la viabilidad por estrés osmótico en espermatozoides de toro [185].

La BSA es considerada un potente antioxidante [184] pero, bajo nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que confirmaba tal efecto en espermatozoides de ciervo. En nuestro estudio, todas las concentraciones de BSA evaluadas, excepto la más inferior (0.003 mg mL⁻¹) mantuvo bajo los niveles de ROS, lo que pudo favorecer el daño en el acrosoma observado con esta concentración [187]. Esta reducción de la integridad acrosomal no fue acompañada por cambios otros parámetros espermáticos. No obstante, estudios previos en ciervos han demostrado que existen niveles de peroxidación compatibles con una funcionalidad íntegra, pero capaces de provocar daños en los acrosomas [189,190].

En relación con la fosforilación en residuos de tirosina, nuestros resultados mostraron que no existieron diferencias entre los diferentes tratamientos con BSA, ni entre estos y el control negativo (NCAP), pero sí entre este último y el CAP. Esto parece

indicar que la respuesta de los espermatozoides tras la adición de BSA no fue completamente similar a las muestras capacitadas, al presentar valores similares en relación al control positivo y negativo. En un estudio previo en ciervo, Tulake et al. [50], observaron un incremento de la fosforilación con el uso de concentraciones altas de BSA (6 y 10 mg mL⁻¹) aunque éste fue menor que el conseguido por el ESS. La capacidad de la BSA para eliminar el colesterol que promueve la posterior fosforilación de tirosina se debe a la presencia de una proteína de cuya actividad podría verse disminuida por los procesos de purificación a los que se someten las BSA comerciales [191]. Es probable que, en nuestro estudio, una deficiente actividad de transferencia de lípidos de la BSA empleada fuera el motivo por el que los espermatozoides de ciervos mostrasen valores intermedios en fosforilación en tirosina en relación al CAP y NCAP.

Tras evaluar la posibilidad de sustituir el ESS por BSA en los medios de CIV y observar que todas las concentraciones de BSA evaluadas generan una respuesta similar en lo que a la fosforilación de tirosina se refiere, nos propusimos estudiar si, en presencia de 3 mg mL⁻¹, la modificación de la concentración del Ca²⁺ y bicarbonato, así como distintos pH podría mejorar los resultados de capacitación obtenidos, por su participación en elevar los niveles de AMPc y la activación de la PKA [80]. Por lo tanto, el objetivo del Capítulo IV de esta Tesis Doctoral fue diseñar un medio de CIV eficiente para espermatozoides de ciervo Ibérico mediante la evaluación de diversas concentraciones de Ca²⁺ y bicarbonato, así como distintos pH sobre la funcionalidad espermática y marcadores de capacitación como el desorden de fosfolípidos de la MP y fosforilación de tirosina.

Nuestros resultados mostraron que la incubación de espermatozoides de ciervo en un SOF formulado con 3 mg mL⁻¹ de BSA, 3 mM de Ca²⁺, 30 mM de NaHCO₃ y un pH 7 (SF-CAP) durante 15 min, mantuvo su funcionalidad y produjo el incremento de los

marcadores de capacitación evaluados (incremento de desorden de fosfolípido de MP y de fosforilación en tirosina) por encima de los observados en los espermatozoides incubados con ESS (CAP). A pesar de esto, cuando estos espermatozoides fueron co-incubados con ovocitos maduros, las tasas de división a las 48 h.p.i. fueron significativamente menores a las obtenidas bajo condiciones de capacitación y fecundación estándar (en presencia de ESS). Sin embargo, no se puede descartar que los ovocitos requieran también la influencia de ciertas concentraciones de estos componentes cuando la co-incubación se realiza sin ESS. De hecho, en caprino se obtienen mejores resultados cuando el medio de fecundación no solo propicia la capacitación de los espermatozoides, sino que también cubre las necesidades del ovocito [225].

A día de hoy, en ciervo, se desconoce el papel del Ca^{2+} y del bicarbonato en funciones como la motilidad espermática y el desarrollo de la capacitación o RA, así como la posterior fecundación, al contrario que en otras especies de mamíferos [36, 48, 206]. Nuestros resultados mostraron que las concentraciones de Ca^{2+} y bicarbonato estudiadas promueven similares valores de motilidad que el medio capacitante, no mostrando un efecto diferencial entre ellas, tal y como antes se había observado en esta especie [181]. Además, el Ca^{2+} y el bicarbonato en los medios de CIV de ciervo son fundamentales para mantener la funcionalidad de los espermatozoides en términos de motilidad e integridad acrosomal pues, en comparación al uso de concentraciones más altas de los dos compuestos (Ca^{2+} y bicarbonato 1 mM), (i) la ausencia o una baja concentración de Ca^{2+} (0.1 mM) hizo que disminuyera la VCL y el LIN, respectivamente, al igual que (ii) la ausencia de bicarbonato disminuyó el LIN de los espermatozoides. Además, el daño del acrosoma fue mayor cuando el Ca^{2+} no estuvo presente. No obstante, en el medio formulado sin bicarbonato el porcentaje de espermatozoides fue similar al de las muestras

capacitadas, posiblemente debido a la presencia en el medio de Ca^{2+} (3 mM) o de lactato sódico los cuales participan en el mantenimiento de la motilidad espermática [215].

En relación a los marcadores de capacitación, la concentración de 3 mM de Ca^{2+} provocó el incremento del desorden de fosfolípidos, así como de la fosforilación en tirosina, lo que podría justificar la mejora reportada en la FIV con el uso de esta concentración en relación a 1.5 y 5 mM de Ca^{2+} [8]. Por su parte, las concentraciones de 25 o 30 mM de bicarbonato resultaron más eficientes en promover estas modificaciones. Además, nuestro trabajo mostró como que estos incrementos fueron significativamente superiores a los valores alcanzados por los espermatozoides incubados con ESS. Estos resultados confirman la importancia de la correcta definición de la concentración de Ca^{2+} y bicarbonato en los medios de CIV de ciervos y revelan que es posible prescindir del ESS para promover las modificaciones compatibles con la capacitación, lo que resulta prometedor para la estandarización de esta fase de la PIVE en esta especie. Si bien la importancia de la concentración de Ca^{2+} del medio de CIV para espermatozoides de ciervo es similar a la observada en morueco en lo que a la remodelación de la MP se refiere, en ovino, ésta parece no afectar a la fosforilación en tirosina [210] aunque en otras especies como porcino o humano pueda llegar a bloquearla [127,213]. Por su parte, para el bicarbonato hay más homogeneidad entre especies y la mayoría de los medios de CIV están formulados con altas concentraciones de este compuesto [89,216,131]. A pesar de lo mencionado, la ausencia de ambos compuestos no impidió las modificaciones compatibles con la capacitación. No obstante, en ausencia de Ca^{2+} en ciervo y de bicarbonato en porcino, la fecundación no es posible [8,220]. Previsiblemente, otros procesos imprescindibles para la fecundación del ovocito, como la RA, pueden verse comprometidos [39]. Sin embargo, nuestro trabajo no puede confirmar estos hechos y son necesarios más estudios que ayuden a la interpretación de estos resultados.

A pesar de que el medio definido tras los experimentos del Ca^{2+} y del bicarbonato (SF-CAP; 3 mM Ca^{2+} ; 30 mM NaHCO_3) promoviese los cambios asociados a la capacitación, restringir o exceder los pHs 6 y 7 disminuyó de forma significativa el desorden de fosfolípidos, la fosforilación de tirosina y la VCL de los espermatozoides. La acidificación y alcalinización directa del pH_i a través del medio [41,222] ha sido asociada con una estimulación deficiente de la vía AMPc/PKA lo que resulta en la inhibición de la fosforilación de tirosina, así como con un descenso del Ca^{2+} intracelular [223], lo que podría justificar la reducción de las modificaciones asociadas a la capacitación con los pHs 5, 8 y 9 en nuestro trabajo. Por su parte, el descenso de la VCL registrada pudo estar relacionada con la incapacidad de los espermatozoides para mantener la homeostasis ácido-base [224] tal y como ha sido demostrado en ovino [221].

En resumen, los resultados de la presente Tesis Doctoral ponen de manifiesto la necesidad de eliminar el ESS de los medios empleados durante la fase de capacitación espermática de la PIVE para evitar que introduzcan variabilidad en los resultados pues, por primera vez se demostró que el uso de ESS extraído de distintas hembras para la CIV estimula de forma diferente el incremento de la fosforilación de proteínas asociado al proceso. Además, los datos aquí obtenidos evidencian que el semen congelado de ciervo requiere de un corto periodo de incubación para llevar a cabo la CIV. Asimismo, el propio proceso de capacitación acelera los eventos de muerte celular y de daño de los atributos espermáticos según progresa, acortando su vida útil, reduciendo su funcionalidad y disminuyendo las posibilidades de fecundación, por lo que incubaciones que sobrepasen los 30 min serían desaconsejables. Además, hemos corroborado que el ESS produce un aumento del desorden de fosfolípidos y de la fosforilación en tirosina y que esta predominantemente ocurre en la cabeza de los espermatozoides. Concretamente, la localización de las proteínas fosforiladas sobre la zona acrosomal y ecuatorial se

correlacionó significativa y positivamente con los mayores valores de tasas de división, y ambos tuvieron lugar durante la primera parte de la incubación ($t < 30$ min). Así mismo, durante la CIV de ciervo la cromatina se encuentra más descondensada, posiblemente como preparación para su posterior remodelación dentro del ovocito. La serie de experimentos realizada permitió definir un medio de CIV (SF-CAP: 3 mg mL^{-1} ; 3 mM Ca^{2+} ; $30 \text{ mM bicarbonato}$) sin ESS alternativo al tradicional el cual desencadenó cambios relacionados con la capacitación espermática por encima de los observados en los espermatozoides incubados con ESS. Al mismo tiempo que se diseñó el medio de capacitación SF-CAP fue posible observar que el pH desempeña un papel importante en la CIV de espermatozoides de ciervo siendo capaz de bloquear la fosforilación en tirosina cuando toma el valor de 5, 8 y 9.

CONCLUSIONS

1. The ability of estrous sheep serum to increase tyrosine phosphorylation of sperm proteins associated with sperm capacitation differs between sera of different sheep but does not affect embryo production or blastocysts quality.
2. Estrous sheep serum promotes sperm capacitation and allow fertilization to occur in deer.
3. Frozen/thawed Iberian deer sperm reached the capacitated state capacitation after a short-time incubation with estrous sheep serum (<30 min).
4. During *in vitro* capacitation of deer sperm occurred a series of sequential and parallel processes that involved the increase in the phospholipid disorder of MP and tyrosine phosphorylation, as well as a decrease in sperm chromatin condensation.
5. During *in vitro* capacitation of deer sperm, tyrosine phosphorylation occurs mainly over the sperm head, changing between its different areas throughout incubation. Tyrosine phosphorylation increased in the equatorial and acrosomal region and then it was reduced to the acrosomal zone due to the dephosphorylation of the equatorial area.
6. Sperm incubations with estrous sheep serum longer than 30 min triggers a gradual reduction of sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial activity, as well as the decrease of the levels of tyrosine phosphorylation.
7. The cleavage rates obtained during the first 30 min of sperm incubation with estrous sheep serum are the highest along the incubation period. At 60 min, embryo division rates decrease.
8. The use of BSA in the capacitation media of deer sperm supports sperm motility, acrosomal integrity, tyrosine phosphorylation and the reduction of high levels of ROS in a proportional way to estrous sheep serum, yet BSA is less effective as capacitating agent.
9. A capacitation medium formulated without ESS and with 3 mg mL⁻¹ of BSA, 3 mM Ca²⁺, 30 mM bicarbonate and a pH 7 triggers changes related to sperm capacitation

above those observed with estrous sheep serum. However, cleavage rates after *in vitro* fertilization were lower than those obtained incubating sperm with estrous sheep serum.

BIBLIOGRAFÍA

1. Asher, G.W.; Berg, D.K.; Evans, G. Storage of semen and artificial insemination in deer. *Anim. Reprod. Sci.* **2000**, *62*, 195–211, doi:10.1016/S0378-4320(00)00159-7.
2. Garde, J.J.; Martínez-Pastor, F.; Gomendio, M.; Malo, A.F.; Soler, A.J.; Fernández-Santos, M.R.; Estesó, M.C.; García, A.J.; Anel, L.; Roldán, E.R.S. The application of reproductive technologies to natural populations of red deer. *Reprod. Domest. Anim.* **2006**, *41*, 93–102, doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00773.x.
3. Anel-López, L.; Garcia-Álvarez, O.; Tarantini, T.; Del Olmo, D.; Ortiz, J.A.; Ledda, S.; Martínez, E.A.; Soler, A.J.; Roca, J.; Fernández Santos, M.R.; et al. Influence of insemination time on the fertility of sex sorted frozen-thawed Y-sperm in red deer. *Theriogenology* **2018**, *113*, 171–175, doi:10.1016/j.theriogenology.2018.03.005.
4. Berg, D.K.; Thongphakdee, A. In Vitro Culture of Deer Embryos. In *Methods in Molecular Biology*; 2019; Vol. 2006, pp. 191–207 ISBN 9781493995660.
5. Morrow, C.J.; Penfold, L.M.; Wolfe, B.A. Artificial insemination in deer and non-domestic bovids. **2009**, *71*, 149–165, doi:10.1016/j.theriogenology.2008.09.001.
6. Comizzoli, P.; Holt, W. V Breakthroughs and new horizons in reproductive biology of rare and endangered animal species. *Biol. Reprod.* **2019**, *101*, 514–525, doi:10.1093/biolre/ioz031.
7. Mermillod, P. In vitro fertilization (IVF). In *Gamete and Embryo Technology*; 2011; pp. 616–622 ISBN 9780128122006.
8. Berg, D.K.; Asher, G.W. New developments reproductive technologies in deer. *Theriogenology* **2003**, *59*, 189–205, doi:10.1016/S0093-691X(02)01272-4.
9. Sirard, M.A. 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. *Reproduction* **2018**, *182*, 870–876, doi:10.1164/rccm.201001-0081CI.
10. Zhu, J.; Moawad, A.R.; Wang, C.-Y.; Li, H.-F.; Ren, J.-Y.; Dai, Y.-F. Advances

- in in vitro production of sheep embryos. *Int. J. Vet. Sci. Med.* **2018**, 0–1, doi:10.1016/j.ijvsm.2018.02.003.
11. Paramio, M.T.; Izquierdo, D. Current status of in vitro embryo production in sheep and goats. *Reprod. Domest. Anim.* **2014**, *49*, 37–48, doi:10.1111/rda.12334.
 12. Maggiolino, A.; Pateiro, M.; Serrano, M.P.; Landete-Castillejos, T.; Domínguez, R.; García, A.; Gallego, L.; De Palo, P.; Lorenzo, J.M. Carcass and meat quality characteristics from Iberian wild red deer (*Cervus elaphus*) hunted at different ages. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 1938–1945, doi:10.1002/jsfa.9391.
 13. Kudrnáčová, E.; Bartoň, L.; Bureš, D.; Hoffman, L.C. Carcass and meat characteristics from farm-raised and wild fallow deer (*Dama dama*) and red deer (*Cervus elaphus*): A review. *Meat Sci.* **2018**, *141*, 9–27.
 14. Amargant, F.; Barragan, M.; Vassena, R.; Vernos, I. Insights of the tubulin code in gametes and embryos: from basic research to potential clinical applications in humans. *Biol. Reprod.* **2018**, doi:10.1093/biolre/ioy203.
 15. Sui, Z.; Zhang, L.; Huo, Y.; Zhang, Y. Bioactive components of velvet antlers and their pharmacological properties. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *87*, 229–240, doi:10.1016/j.jpba.2013.07.044.
 16. Queirós, J.; Acevedo, P.; Santos, J.P.V.; Barasona, J.; Beltran-Beck, B.; González-Barrio, D.; Armenteros, J.A.; Diez-Delgado, I.; Boadella, M.; de Mera, I.F.; et al. *Red deer in Iberia: Molecular ecological studies in a southern refugium and inferences on European postglacial colonization history*; 2019; Vol. 14; ISBN 1111111111.
 17. Montserrat Gomendio, Aurelio F. Malo, Ana J. Soler, Maria R. Fernandez-Santos, Milagros C. Estesó, Andrés J. García, Eduardo R. S. Roldan, J.G. Male Fertility and Sex Ratio at Birth in Red Deer. *Science (80-.)*. **2006**, *314*, 1445–1446, doi:10.1126/science.1132027.
 18. Lu, K.H.; Seidel, G.E. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow

- cytometrically-sorted sperm. *Theriogenology* **2004**, *62*, 819–830, doi:10.1016/j.theriogenology.2003.12.029.
19. Soler, A.J.; Poulin, N.; Fernández-Santos, M.R.; Cognie, Y.; Estes, M.C.; Garde, J.J.; Mermillod, P. Heterologous in vitro fertility evaluation of cryopreserved Iberian red deer epididymal spermatozoa with zona-intact sheep oocytes and its relationship with the characteristics of thawed spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* **2008**, *43*, 293–298, doi:10.1111/j.1439-0531.2007.00893.x.
 20. Soler, A.J.; Garde, J. Relationship Between the Characteristics of Epididymal Red Deer Spermatozoa and Penetrability Into Zona-Free Hamster Ova. *J. Androl.* **2003**, *24*, 393–400, doi:10.1002/j.1939-4640.2003.tb02688.x.
 21. Fléchon, J.E. The acrosome of eutherian mammals. *Cell Tissue Res.* **2016**, *363*, 147–157, doi:10.1007/s00441-015-2238-0.
 22. Locatelli, Y.; Hendriks, A.; Vallet, J.C.; Baril, G.; Duffard, N.; Bon, N.; Ortiz, K.; Scala, C.; Maurel, M.C.; Mermillod, P.; et al. Assessment LOPU-IVF in Japanese sika deer (*Cervus nippon nippon*) and application to Vietnamese sika deer (*Cervus nippon pseudaxis*) a related subspecies threatened with extinction. *Theriogenology* **2012**, *78*, 2039–2049, doi:10.1016/j.theriogenology.2012.07.025.
 23. Maxwell, W.M.C.; Evans, G.; Hollinshead, F.K.; Bathgate, R.; De Graaf, S.P.; Eriksson, B.M.; Gillan, L.; Morton, K.M.; O'Brien, J.K. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Anim. Reprod. Sci.* **2004**, *82–83*, 79–95, doi:10.1016/j.anireprosci.2004.04.013.
 24. Paramio, M.T.; Izquierdo, D. Recent advances in in vitro embryo production in small ruminants. *Theriogenology* **2016**, *86*, 152–159, doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.027.
 25. Griffin, J.F.T.; Thomson, A.J. FARMED DEER : A LARGE ANIMAL MODEL FOR STRESS. **1998**, *15*, 445–456.
 26. García, A.J.; Landete-Castillejos, T.; Garde, J.J.; Gallego, L. Reproductive seasonality in female Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*).

- Theriogenology* **2002**, 58, 1553–1562, doi:10.1016/S0093-691X(02)01048-8.
27. Dolan, J.M. *A Deer of Many Lands: A Guide to the Subspecies of the Red Deer, Cervus Elaphus L.*; 1988;
 28. Ceacero, F.; Gaspar-lópez, E.; Landete-castillejos, T.; Gallego, L.; García, A.J. Social rank affects the haematologic profile in red deer hinds. *Vet. Rec.* **2018**, 32, 1–6, doi:10.1136/vr.104629.
 29. Griffin, J.F.T. Stress and immunity: A unifying concept. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1989, 20, 263–312.
 30. Anel-López, L.; Garcia-Álvarez, O.; Maroto-Morales, A.; Tarantini, T.; Del Olmo, D.; Ortiz, J.A.; Martínez, E.A.; Roca, J.; Vazquez, J.M.; Garde, J.J.; et al. Optimization of protocols for Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) sperm handling before sex sorting by flow cytometry. *Theriogenology* **2017**, 92, 129–136, doi:10.1016/j.theriogenology.2017.01.023.
 31. Locatelli, Y.; Hendriks, A.; Vallet, J.C.; Baril, G.; Duffard, N.; Bon, N.; Ortiz, K.; Scala, C.; Maurel, M.C.; Mermillod, P.; et al. Assessment LOPU-IVF in Japanese sika deer (*Cervus nippon nippon*) and application to Vietnamese sika deer (*Cervus nippon pseudaxis*) a related subspecies threatened with extinction. *Theriogenology* **2012**, 78, 2039–2049, doi:10.1016/j.theriogenology.2012.07.025.
 32. Lincoln, G.A.; Short, R. V. Seasonal breeding: nature's contraceptive. *Recent Prog. Horm. Res.* 1980, 36, 1–52.
 33. Asher, G.W.; Monfort, S.L.; Wemmer, C. Comparative reproductive function in cervids: implications for management of farm and zoo populations. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **1999**, 54, 143–156, doi:10.1530/biosciproc.4.011.
 34. Asher, G.W.; O'Neill, K.T.; Scott, I.C.; Mockett, B.G.; Pearse, A.J. Genetic influences on reproduction of female red deer (*Cervus elaphus*). (2) Seasonal and genetic effects on the superovulatory response to exogenous FSH. *Anim. Reprod. Sci.* **2000**, 59, 61–70, doi:10.1016/S0378-4320(00)00066-X.
 35. Visconti, P.E. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through

- kinase design. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 667–668, doi:10.1073/pnas.0811895106.
36. Visconti, P.E.; Bailey, J.L.; Moore, G.D.; Pan, D.; Olds-Clarke, P.; Kopf, G.S. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein phosphorylation. *Development* **1995**, *121*, 1129–1137, doi:10.1148/radiol.12111561.
37. Austin, C.R. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* 1952, *170*, 326.
38. Chang, M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes [9]. *Nature* **1951**, *168*, 697–698, doi:10.1038/168697b0.
39. Yanagimachi, R. Fertility of mammalian spermatozoa: Its development and relativity. *Zygote* 1994, *2*, 371–372.
40. PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; FIRST, N.L. Capacitation of Bovine Sperm by Heparin: Inhibitory Effect of Glucose and Role of Intracellular pH1. *Biol. Reprod.* **1989**, *41*, 683–699, doi:10.1095/biolreprod41.4.683.
41. Zeng, Y.; Oberdorf, J.A.; Florman, H.M. pH Regulation in Mouse Sperm : Identification Arylaminobenzoate-Dependent Regulatory Mechanisms and Characterization of Their Roles in Sperm Capacitation. **1996**, *520*, 510–520.
42. Visconti, P.E.; Krapf, D.; De La Vega-Beltrán, J.L.; Acevedo, J.J.; Darszon, A. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J. Androl.* **2011**, *13*, 395–405, doi:10.1038/aja.2010.69.
43. Darszon, A.; Nishigaki, T.; Beltran, C.; Treviño, C.L. Calcium channels in te development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol Rev* **2011**, *91*, 1305–1355, doi:10.1152/physrev.00028.2010.-A.
44. Gadella, B.M.; P Harrison, R.A. Modulation of sperm plasma membrane lipid asymmetry. *Development* **2000**, 2407–2420.
45. Harrison, R.A.P. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* **1996**, *8*, 581–594, doi:10.1071/RD9960581.

46. Salicioni, A.M.; Platt, M.D.; Wertheimer, E. V.; Arcelay, E.; Allaire, A.; Sosnik, J.; Visconti, P.E. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* **2007**, *65*, 245–259.
47. Esposito, G.; Jaiswal, B.S.; Xie, F.; Krajnc-Franken, M.A.M.; Robben, T.J.A.A.; Strik, A.M.; Kuil, C.; Philipsen, R.L.A.; Van Duin, M.; Conti, M.; et al. Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 2993–2998, doi:10.1073/pnas.0400050101.
48. Gervasi, M.G.; Visconti, P.E. Chang’s meaning of capacitation: A molecular perspective. *Mol. Reprod. Dev.* **2016**, *83*, 860–874, doi:10.1002/mrd.22663.
49. Hess, K.C.; Jones, B.H.; Marquez, B.; Chen, Y.; Ord, T.S.; Kamenetsky, M.; Miyamoto, C.; Zippin, J.H.; Kopf, G.S.; Suarez, S.S.; et al. The “soluble” adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev. Cell* **2005**, *9*, 249–259, doi:10.1016/j.devcel.2005.06.007.
50. Tulake, K.; Wang, X.; Chen, Y.; Yu, C.; Jing, B.; Li, H. Protein tyrosine phosphorylation during capacitation in sperm of a rare red deer, Tarim wapiti (*Cervus elaphus yarkandensis*). *Anim. Reprod. Sci.* **2015**, *154*, 68–78, doi:10.1016/j.anireprosci.2014.11.020.
51. Huneau, D.; Crozet, N.; Ahmed-Ali, M. Estrous sheep serum as a potent agent for ovine IVF: Effect on cholesterol efflux from spermatozoa and the acrosome reaction. *Theriogenology* **1994**, *42*, 1017–1028, doi:10.1016/0093-691X(94)90123-Z.
52. Peris-Frau, P.; Martín-Maestro, A.; Iniesta-Cuerda, M.; Sánchez-Ajofrín, I.; Cesari, A.; Garde, J.J.; Villar, M.; Soler, A.J. Cryopreservation of ram sperm alters the dynamic changes associated with in vitro capacitation Article. *Theriogenology* **2020**.
53. García-Álvarez, O.; Maroto-Morales, A.; Jiménez-Rabadán, P.; Ramón, M.; del Olmo, E.; Iniesta-Cuerda, M.; Anel-López, L.; Fernández-Santos, M.R.; Garde, J.J.; Soler, A.J. Effect of different media additives on capacitation of frozen-thawed ram spermatozoa as a potential replacement for estrous sheep serum.

- Theriogenology* **2015**, *84*, 948–955, doi:10.1016/j.theriogenology.2015.05.032.
54. van der Valk, J.; Bieback, K.; Buta, C.; Cochrane, B.; Dirks, W.G.; Fu, J.; Hickman, J.J.; Hohensee, C.; Kolar, R.; Liebsch, M.; et al. Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *ALTEX* **2018**, *35*, 99–118, doi:10.14573/altex.1705101.
55. Blunt, M.H. *The blood of the sheep. Composition and Function*; New York, NY, 1975; ISBN 978-3-642-66115-0.
56. Bavister, B.D. Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts. *Hum. Reprod. Update* **1995**, *1*, 91–148, doi:10.1093/humupd/1.2.91.
57. Dormont, D. Transmissible spongiform encephalopathy agents and animal sera. *Dev. Biol. Stand.* 1999, *99*, 25–34.
58. Wessman, S.J.; Levings, R.L. Benefits and risks due to animal serum used in cell culture production. *Dev. Biol. Stand.* **1999**, *99*, 3–8.
59. William Hawkes, P. Fetal bovine serum: geographic origin and regulatory relevance of viral contamination. *Bioresour. Bioprocess.* **2015**, *2*, 34, doi:10.1186/s40643-015-0063-7.
60. OECD OECD Series on Testing and Assessment. *OECD Publ.* **2018**, doi:10.1787/9789264304796-en.
61. Shirazi, A.; Ardali, M.A.; Ahmadi, E.; Nazari, H.; Mamuee, M.; Heidari, B. The effect of macromolecule source and type of media during in vitro maturation of sheep oocytes on subsequent embryo development. *J. Reprod. Infertil.* **2012**, *13*, 13–19.
62. Thompson, J.G.; Gardner, D.K.; Anne Pugh, P.; McMillan, W.H.; Robin Tervit, H. *Lamb Birth Weight is Affected by Culture System Utilized during in Vitro Pre-Elongation Development of Ovine Embryos*; 1995; Vol. 53;.
63. Thompson, J.G.; Simpson, A.C.; Pugh, P.A.; Tervit, H.R. In vitro development of early sheep embryos is superior in medium supplemented with human serum compared with sheep serum or human serum albumin. *Anim. Reprod. Sci.* **1992**,

- 29, 61–68, doi:10.1016/0378-4320(92)90020-E.
64. Amann, R.P. Seminal Can Sample the Fertility Be Predicted Potential of a Accurately ?*. *J. Androl.* **1989**, *10*, 89–98.
65. Lasiene, K.; Gedrimas, V.; Vitkus, A.; Glinskyte, S.; Lasys, V.; Valanciute, A.; Sienkiewicz, W. Evaluation of morphological criteria of sperm quality before in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Pol. J. Vet. Sci.* **2013**, *16*, 773–785, doi:10.2478/pjvs-2013-0112.
66. Liang, S.; Guo, J.; Choi, J.W.; Kim, N.H.; Cui, X.S. Effect and possible mechanisms of melatonin treatment on the quality and developmental potential of aged bovine oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.* **2017**, *29*, 1821–1831, doi:10.1071/RD16223.
67. Bailey, J.L.; Bilodeau, J.F.; Cormier, N. Minireview: Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.* **2000**, *21*, 1–7, doi:10.1002/j.1939-4640.2000.tb03268.x.
68. Pini, T.; Leahy, T.; de Graaf, S.P. Sublethal sperm freezing damage: Manifestations and solutions. *Theriogenology* **2018**, *118*, 172–181, doi:10.1016/j.theriogenology.2018.06.006.
69. Gillan, L.; Evans, A.G.; Maxwell, W.M.C. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* **1997**, *9*, 481–487, doi:10.1071/R96046.
70. Watson, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* **1995**, *7*, 871–891, doi:10.1071/RD9950871.
71. Garde, J.; Gutierrez, A.; Artiga, C.; Vazquez, I. Influence of freezing process on “in vitro” capacitation. *Theriogenology* **1993**, *39*, 225.
72. Kańska-Książkiewicz, L.; Ryńska, B.; Gajda, B.; Smorąg, Z. Effect of donor stimulation, frozen semen and heparin treatment on the efficiency of in vitro embryo production in goats. *Theriogenology* **2004**, *62*, 576–586,

- doi:10.1016/j.theriogenology.2003.11.007.
73. Zhou, J.B.; Wu, Y.G.; Liu, L.Q.; Luo, M.J.; Chang, Z. Le; Tan, X.W.; Liu, N.; Tan, J.H. Studies on in vitro capacitation of goat spermatozoa by heparin treatment. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 2004, 20, 252–256.
74. Bainbridge, D.R.J.; Catt, S.L.; Evans, G.; Jabbour, H.N. Successful in vitro fertilization of in vivo matured oocytes aspirated laparoscopically from red deer hinds (*Cervus elaphus*). *Theriogenology* **1999**, 51, 891–898, doi:10.1016/S0093-691X(99)00036-9.
75. Berg, D.; Pugh, P.; Thompson, J.; Asher, G.. Development of in vitro embryo production systems for red deer (*Cervus elaphus*). *Anim. Reprod. Sci.* **2002**, 70, 85–98, doi:10.1016/S0378-4320(01)00201-9.
76. Comizzoli, P.; Mermillod, P.; Cognié, Y.; Chai, N.; Legendre, X.; Mauget, R. Successful in vitro production of embryos in the red deer (*Cervus elaphus*) and the sika deer (*Cervus nippon*). *Theriogenology* **2001**, 55, 649–659, doi:10.1016/S0093-691X(01)00433-2.
77. Fukui, Y.; McGowan, L.T.; James, R.W.; Asher, G.W.; Tervit, H.R. Effects of culture duration and time of gonadotropin addition on in vitro maturation and fertilization of red deer (*Cervuselaphus*) oocytes. *Theriogenology* **1991**, 35, 499–512, doi:10.1016/0093-691X(91)90446-K.
78. Sánchez-Ajofrín, I.; Iniesta-Cuerda, M.; Sánchez-Calabuig, M.J.; Peris-Frau, P.; Martín-Maestro, A.; Ortiz, J.A.; del Rocío Fernández-Santos, M.; Garde, J.J.; Gutiérrez-Adán, A.; Soler, A.J. Oxygen tension during in vitro oocyte maturation and fertilization affects embryo quality in sheep and deer. *Anim. Reprod. Sci.* **2020**, 213, doi:10.1016/j.anireprosci.2020.106279.
79. Thongphakdee, A.; Berg, D.K.; Tharasanit, T.; Thongtip, N.; Tipkantha, W.; Punkong, C.; Tongthainan, D.; Noimoon, S.; Maikeaw, U.; Kajornklin, N.; et al. The impact of ovarian stimulation protocol on oocyte quality, subsequent in vitro embryo development, and pregnancy after transfer to recipients in Eld's deer (*Rucervus eldii thamin*). *Theriogenology* **2017**, 91, 134–144, doi:10.1016/j.theriogenology.2016.12.021.

80. Visconti, P.E.; Galantino-Homer, H.; Moore, G.D.; Bailey, J.L.; Ning, X.; Fornes, M.; Kopf, G.S. The molecular basis of sperm capacitation. *J. Androl.* **1998**, *19*, 242–248, doi:10.1002/j.1939-4640.1998.tb01994.x.
81. Silva, P.F.N.; Gadella, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* **2006**, *65*, 958–978, doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.010.
82. Bernecic, N.C.; Gadella, B.M.; Graaf, S.P. de; Leahy, T. Synergism between albumin, bicarbonate and cAMP upregulation for cholesterol efflux from ram sperm. *Reproduction* **2020**, *160*, 269–280, doi:10.1530/REP-11-0286.
83. Visconti, P.E.; Westbrook, V.A.; Chertihin, O.; Demarco, I.; Sleight, S.; Diekman, A.B. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J. Reprod. Immunol.* **2002**, *53*, 133–150, doi:10.1016/S0165-0378(01)00103-6.
84. Gadella, B.M.; Tsai, P.-S.; Boerke, A.; Brewis, I.A. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int. J. Dev. Biol.* **2008**, *52*, 473–80, doi:10.1387/ijdb.082583bg.
85. Chen, Y.; Chen, Y.; Cann, M.J.; Litvin, T.N.; Iourgenko, V.; Sinclair, M.L.; Levin, L.R.; Buck, J. Soluble Adenylyl Cyclase as an Evolutionarily Conserved Bicarbonate Sensor. **2012**, *625*, doi:10.1126/science.289.5479.625.
86. Wennemuth, G.; Carlson, A.E.; Harper, A.J.; Babcock, D.F. Bicarbonate actions on flagellar and Ca²⁺-channel responses: Initial events in sperm activation. *Development* **2003**, *130*, 1317–1326.
87. Harrison, R.A.P. Rapid PKA-Catalysed Phosphorylation of Boar Sperm Proteins Induced by the Capacitating Agent Bicarbonate. *Mol. Reprod. Dev.* **2004**, *67*, 337–352, doi:10.1002/mrd.20028.
88. Leahy, T.; Gadella, B. Asian Journal of Andrology Cholesterol efflux from the sperm membrane. *Asian J. Androl.* **2015**, *17*, 561–567.
89. Parrish, J.J. Capacitation of Bovine Sperm by Heparin : Inhibitory Effect of Glucose and Role of Intracellular pHI. **1989**, *699*, 683–699.

90. González-Fernández, L.; Macías-García, B.; Velez, I.C.; Varner, D.D.; Hinrichs, K. Calcium-calmodulin and pH regulate protein tyrosine phosphorylation in stallion sperm. *Reproduction* **2012**, *144*, 411–422, doi:10.1530/REP-12-0067.
91. Galantino-Homer, H.L.; Florman, H.M.; Storey, B.T.; Dobrinski, I.; Kopf, G.S. Bovine Sperm Capacitation: Assessment of Phosphodiesterase Activity and Intracellular Alkalinization on Capacitation-Associated Protein Tyrosine Phosphorylation. *Mol. Reprod. Dev.* **2004**, *67*, 487–500, doi:10.1002/mrd.20034.
92. Cognié, Y.; Poulin, N.; Locatelli, Y.; Mermillod, P. State-of-the-art production, conservation and transfer of in-vitro-produced embryos in small ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* **2004**, *16*, 437–445, doi:10.1071/RD04029.
93. Li, F.; Pi, W.H.; Zhu, H.Z.; Zhang, S.S.; Liu, S.R.; Xue, J.L. The effect of estrous ewe serum and heparin on in vitro fertilization and subsequent embryonic development in sheep. *Small Rumin. Res.* **2006**, *63*, 226–232, doi:10.1016/j.smallrumres.2005.02.019.
94. Austin, C.R. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res. B.* **1951**, *4*, 581–596, doi:10.1071/BI9510581.
95. Okabe, M. Sperm – egg interaction and fertilization : past , present , and future. *Biol. Reprod.* **2018**, *99*, 134–146, doi:10.1093/biolre/iy028.
96. Parrish, J.J.; Susko-Parrish, J.L.; Handrow, R.R.; Sims, M.M.; First, N.L. Capacitation of Bovine Spermatozoa by Oviduct Fluid1. *Biol. Reprod.* **1989**, *40*, 1020–1025, doi:10.1095/biolreprod40.5.1020.
97. King, R.S.; Anderson, S.H.; Killian, G.J. Effect of Bovine Oviductal Estrus-Associated Protein on the Ability of Sperm to Capacitate and Fertilize Oocytes. *J. Androl.* **1994**, *15*, 468–478, doi:10.1002/j.1939-4640.1994.tb00482.x.
98. Avilés, M.; Gutiérrez-Adán, A.; Coy, P. Oviductal secretions: Will they be key factors for the future ARTs? *Mol. Hum. Reprod.* **2010**, *16*, 896–906.
99. Huneau, D.; Crozet, N.; Ahmed-Ali, M. Estrous sheep serum as a potent agent for ovine IVF: Effect on cholesterol efflux from spermatozoa and the acrosome

- reaction. *Theriogenology* **1994**, *42*, 1017–1028, doi:10.1016/0093-691X(94)90123-Z.
100. Senger, P.L.; Mccutchan, J.F.; Hillers, J.K. Influence of Blood Serum from Bulls and Heifers on Head-to-Head Agglutination and Acrosomal Maintenance in Bovine Spermatozoa. *Biol. Reprod.* **1981**, *25*, 433–437, doi:10.1095/biolreprod25.2.433.
101. Brandt, Y.; Lundeheim, N.; Madej, A.; Rodriguez-Martinez, H.; Einarsson, S. Effects of ACTH injections during estrus on concentrations and patterns of progesterone, estradiol, LH, and inhibin α and time of ovulation in the sow. *Domest. Anim. Endocrinol.* **2007**, *32*, 122–137, doi:10.1016/j.domaniend.2006.02.002.
102. González, R.; Kumaresan, A.; Bergqvist, A.S.; Sjunnesson, Y.C.B. Blood plasma collected after adrenocorticotrophic hormone administration during the preovulatory period in the sow negatively affects invitro fertilization by disturbing spermatozoa function. *Theriogenology* **2015**, *83*, 1128–1139, doi:10.1016/j.theriogenology.2014.12.017.
103. Valk, J. van der; D. Brunner, K.; De Smet, Å.; Svenningsen, F.; P. Honegger, L.; Knudsen, T.; Lindl, J.; Noraberg, A.; Price, M.L.; Scarino, G.; et al. Optimization of chemically defined cell culture media. *Toxicol. Vitro.* **2010**, *4*, 1054–163, doi:doi: 10.1016/j.tiv.2010.03.016.
104. Shih, Y.F.; Tzeng, S.L.; Chen, W.J.; Huang, C.C.; Chen, H.H.; Lee, T.H.; Lee, M.S. Effects of Synthetic Serum Supplementation in Sperm Preparation Media on Sperm Capacitation and Function Test Results. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 1–8, doi:10.1155/2016/1027158.
105. Wrenzycki, C.; Herrmann, D.; Carnwath, J.W.; Niemann, H. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol. Reprod. Dev.* **1999**, *53*, 8–18, doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199905)53:1<8::AID-MRD2>3.0.CO;2-K.
106. Rizos, D.; Gutiérrez-Adán, A.; Pérez-Garnelo, S.; de la Fuente, J.; Boland, M.P.;

- Lonergan, P. Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Messenger RNA Expression. *Biol. Reprod.* **2003**, *68*, 236–243, doi:10.1095/biolreprod.102.007799.
107. Aleo, J.J.; Padh, H. Inhibition of Ascorbic Acid Uptake by Endotoxin: Evidence of Mediation by Serum Factor(s). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1985**, *179*, 128–131, doi:10.3181/00379727-179-1-RC1.
108. Bradbury, K.; Aparicio, S.R.; Sumner, D.W.; Bird, C.C. Role of complement in demyelination in vitro by multiple sclerosis serum and other neurological disease sera. *J. Neurol. Sci.* **1984**, *65*, 293–305, doi:10.1016/0022-510X(84)90092-3.
109. Pinyopummintr, T.; Bavister, B.D. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: Effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology* **1994**, *41*, 1241–1249, doi:10.1016/0093-691X(94)90481-W.
110. Del Olmo, E.; García-Álvarez, O.; Maroto-Morales, A.; Ramón, M.; Iniesta-Cuerda, M.; Martínez-Pastor, F.; Montoro, V.; Soler, A.J.; Garde, J.J.; Fernández-Santos, M.R. Oestrous sheep serum balances ROS levels to supply in vitro capacitation of ram spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* **2016**, *51*, 743–750, doi:10.1111/rda.12741.
111. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685, doi:10.1038/227680a0.
112. Bermejo-Álvarez, P.; Rizos, D.; Rath, D.; Lonergan, P.; Gutiérrez-Adán, A. Can Bovine In Vitro-Matured Oocytes Selectively Process X- or Y-Sorted Sperm Differentially? *Biol. Reprod.* **2008**, *79*, 594–597, doi:10.1095/biolreprod.108.070169.
113. Ririe, K.M.; Rasmussen, R.P.; Wittwer, C.T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **1997**, *245*, 154–160, doi:10.1006/abio.1996.9916.
114. Schmittgen, T.D.; Livak, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative

- CT method. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1101–1108, doi:10.1038/nprot.2008.73.
115. Peris-Frau, P.; Martín-Maestro, A.; Iniesta-Cuerda, M.; Sánchez-Ajofrín, I.; Cesari, A.; Garde, J.J.; Villar, M.; Soler, A.J. Cryopreservation of ram sperm alters the dynamic changes associated with in vitro capacitation. *Theriogenology* **2020**.
116. Pérez-Pé, R.; Grasa, P.; Fernández-Juan, M.; Peleato, M.L.; Cebrián-Pérez, J.Á.; Muiño-Blanco, T. Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* **2002**, *61*, 226–233, doi:10.1002/mrd.1152.
117. Colas, C.; James, P.; Howes, L.; Jones, R.; Cebrian-Perez, J.A.; Muiño-Blanco, T. Cyclic-AMP initiates protein tyrosine phosphorylation independent of cholesterol efflux during ram sperm capacitation. *Reprod. Fertil. Dev.* **2008**, *20*, 649–658, doi:10.1071/RD08023.
118. Jagan Mohanarao, G.; Atreja, S.K. Identification of capacitation associated tyrosine phosphoproteins in buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* **2011**, *123*, 40–47, doi:10.1016/j.anireprosci.2010.11.013.
119. Dubé, C.; Tardif, S.; Leclerc, P.; Bailey, J.L. The Importance of Calcium in the Appearance of p32, a Boar Sperm Tyrosine Phosphoprotein, during In Vitro Capacitation. *J. Androl.* **2003**, *24*, 727–733, doi:10.1002/j.1939-4640.2003.tb02734.x.
120. Yeste, M.; Fernández-Novell, J.M.; Ramió-Lluch, L.; Estrada, E.; Rocha, L.G.; Cebrián-Pérez, J.A.; Muiño-Blanco, T.; Concha, I.I.; Ramírez, A.; Rodríguez-Gil, J.E. Intracellular calcium movements of boar spermatozoa during “in vitro” capacitation and subsequent acrosome exocytosis follow a multiple-storage place, extracellular calcium-dependent model. *Andrology* **2015**, *3*, 729–747, doi:10.1111/andr.12054.
121. Kumar, V.; Rangaraj, N.; Shivaji, S. Activity of Pyruvate Dehydrogenase A (PDHA) in Hamster Spermatozoa Correlates Positively with Hyperactivation and Is Associated with Sperm Capacitation1. *Biol. Reprod.* **2006**, *75*, 767–777, doi:10.1095/biolreprod.106.053587.

122. Schumacher, J.; Ramljak, S.; Asif, A.R.; Schaffrath, M.; Zischler, H.; Herlyn, H. Evolutionary conservation of mammalian sperm proteins associates with overall, not tyrosine, phosphorylation in human spermatozoa. *J. Proteome Res.* **2013**, *12*, 5370–5382, doi:10.1021/pr400228c.
123. Sirard, M.A. 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. *Reproduction* 2018, *156*, R1–R7.
124. Comizzoli, P.; Paulson, E.E.; McGinnis, L.K. The mutual benefits of research in wild animal species and human-assisted reproduction. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2018**, *35*, 551–560, doi:10.1007/s10815-018-1136-2.
125. Lonergan, P.; Fair, T. The ART of studying early embryo development: Progress and challenges in ruminant embryo culture. *Theriogenology* 2014, *81*, 49–55.
126. Rodriguez-Martinez, H. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology* **2007**, *68*, 138–146, doi:10.1016/j.theriogenology.2007.03.018.
127. Baker, M.A.; Hetherington, L.; Ecrpyd, H.; Roman, S.D.; Aitken, R.J. Analysis of the mechanism by which calcium negatively regulates the tyrosine phosphorylation cascade associated with sperm capacitation. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 211–222, doi:10.1242/jcs.00842.
128. Carrera, A.; Moos, J.; Ning, X.P.; Gerton, G.L.; Tesarik, J.; Kopf, G.S.; Moss, S.B. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: Identification of A Kinase Anchor Proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Dev. Biol.* **1996**, *180*, 284–296, doi:10.1006/dbio.1996.0301.
129. Kulanand, J.; Shivaji, S. Capacitation-associated changes in protein tyrosine phosphorylation, hyperactivation and acrosome reaction in hamster spermatozoa. *Andrologia* **2001**, *33*, 95–104.
130. Tardif, S.; Dubé, C.; Chevalier, S.; Bailey, J.L. Capacitation Is Associated with Tyrosine Phosphorylation and Tyrosine Kinase-Like Activity of Pig Sperm Proteins1. *Biol. Reprod.* **2001**, *65*, 784–792, doi:10.1095/biolreprod65.3.784.

131. Berg, D.K.; Pugh, P.A.; Thompson, J.G.; Asher, G.W. Development of in vitro embryo production systems for red deer (*Cervus elaphus*) Part 3. In vitro fertilisation using sheep serum as a capacitating agent and the subsequent birth of calves. *Anim. Reprod. Sci.* **2002**, *70*, 85–98, doi:10.1016/S0378-4320(01)00201-9.
132. Kumaresan, A.; Johannisson, A.; Bergqvist, A.S. Sperm function during incubation with oestrus oviductal fluid differs in bulls with different fertility. *Reprod. Fertil. Dev.* **2017**, *29*, 1096–1106, doi:10.1071/RD15474.
133. Comizzoli, P.; Mauget, R.; Mermillod, P. Assessment of in vitro fertility of deer spermatozoa by heterologous IVF with zona-free bovine oocytes. *Theriogenology* **2001**, *56*, 261–274, doi:10.1016/S0093-691X(01)00561-1.
134. De Smedt, V.; Crozet, N.; Ahmed-Ali, M.; Martino, A.; Cognié, Y. In vitro maturation and fertilization of goat oocytes. *Theriogenology* **1992**, *37*, 1049–1060, doi:10.1016/0093-691X(92)90103-X.
135. Iniesta-Cuerda, M.; Sánchez-Ajofrín, I.; García-Álvarez, O.; Martín-Maestro, A.; Peris-Frau, P.; Ortiz, J.A.; Fernández-Santos, M. del R.; Garde, J.; Soler, A.J. Influence of fetal calf serum supplementation during in vitro embryo culture in Iberian red deer. *Reprod. Domest. Anim.* **2019**, *54*, 69–71, doi:10.1111/rda.13498.
136. Zhu, J.; Moawad, A.R.; Wang, C.-Y.; Li, H.-F.; Ren, J.-Y.; Dai, Y.-F. Advances in in vitro production of sheep embryos. *Int. J. Vet. Sci. Med.* **2018**, *6*, S15–S26, doi:10.1016/j.ijvsm.2018.02.003.
137. Pini, T.; Rickard, J.P.; Leahy, T.; Crossett, B.; Druart, X.; de Graaf, S.P. Cryopreservation and egg yolk medium alter the proteome of ram spermatozoa. *J. Proteomics* **2018**, *181*, 73–82, doi:10.1016/j.jprot.2018.04.001.
138. Martínez-Pastor, F.; Martínez, F.; García-Macías, V.; Estesó, M.C.; Anel, E.; Fernández-Santos, M.R.; Soler, A.J.; de Paz, P.; Garde, J.; Anel, L. A pilot study on post-thawing quality of Iberian red deer spermatozoa (epididymal and electroejaculated) depending on glycerol concentration and extender osmolality. *Theriogenology* **2006**, *66*, 1165–1172, doi:10.1016/j.theriogenology.2006.03.027.

139. Soler, A.J.; García, A.J.; Fernández-Santos, M.R.; Estesó, M.C.; Garde, J.J. Effects of Thawing Procedure on Postthawed In Vitro Viability and In Vivo Fertility of Red Deer Epididymal Spermatozoa Cryopreserved at -196°C. *J. Androl.* **2003**, *24*, 746–756, doi:10.1002/j.1939-4640.2003.tb02737.x.
140. García-Álvarez, O.; Maroto-Morales, A.; Berlinguer, F.; Fernández-Santos, M.R.; Estesó, M.C.; Mermillod, P.; Ortiz, J.A.; Ramon, M.; Pérez-Guzmán, M.D.; Garde, J.J.; et al. Effect of storage temperature during transport of ovaries on in vitro embryo production in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Theriogenology* **2011**, *75*, 65–72, doi:10.1016/j.theriogenology.2010.07.011.
141. Tervit, H.R.; Whittingham, D.G.; Rowson, L.E. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.* **1972**, *30*, 493–497, doi:10.1530/jrf.0.0300493.
142. De Smedt, V.; Crozet, N.; Ahmed-Ali, M.; Martino, A.; Cognié, Y. In vitro maturation and fertilization of goat oocytes. *Theriogenology* **1992**, *37*, 1049–1060.
143. Iniesta-Cuerda, M.; Sánchez-Ajofrín, I.; García-Álvarez, O.; Martín-Maestro, A.; Peris-Frau, P.; Ortiz, J.A.; Fernández-Santos, M.R.; Garde, J.J.; Soler, A.J. Influence of foetal calf serum supplementation during in vitro embryo culture in Iberian red deer. *Reprod. Domest. Anim.* **2019**, *54*, 69–71, doi:10.1111/rda.13498.
144. Anel-López, L.; García-Álvarez, O.; Parrilla, I.; Del Olmo, D.; Fernández-Santos, M.R.; Soler, A.J.; Maroto-Morales, A.; Ortiz, J.A.; Alkmin, D. V.; Tarantini, T.; et al. The Effect of Oxidative Stress on Thawed Bulk-Sorted Red Deer Sperm. *Reprod. Domest. Anim.* **2016**, *51*, 407–414, doi:10.1111/rda.12694.
145. Evenson, D.; Jost, L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci.* **2000**, *22*, 169–189, doi:10.1023/A:1009844109023.
146. Evenson, D.P. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod.* **1999**, *14*, 1039–1049, doi:10.1093/humrep/14.4.1039.

147. Kumaresan, A.; Johannisson, A.; Humblot, P.; Bergqvist, A.S. Oviductal fluid modulates the dynamics of tyrosine phosphorylation in cryopreserved boar spermatozoa during capacitation. *Mol. Reprod. Dev.* **2012**, *79*, 525–540, doi:10.1002/mrd.22058.
148. Gadella, B.M.; Boerke, A. An update on post-ejaculatory remodeling of the sperm surface before mammalian fertilization. *Theriogenology* **2016**, *85*, 113–124, doi:10.1016/j.theriogenology.2015.07.018.
149. Kumaresan, A.; Johannisson, A.; Humblot, P.; Bergqvist, A.S. Effect of bovine oviductal fluid on motility, tyrosine phosphorylation, and acrosome reaction in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology* **2019**, *124*, 48–56, doi:10.1016/j.theriogenology.2018.09.028.
150. Coy, P.; Lloyd, R.; Romar, R.; Satake, N.; Matas, C.; Gadea, J.; Holt, W. V. Effects of porcine pre-ovulatory oviductal fluid on boar sperm function. *Theriogenology* **2010**, *74*, 632–642, doi:10.1016/j.theriogenology.2010.03.005.
151. Moraes, C.R.; Meyers, S. The sperm mitochondrion: Organelle of many functions. *Anim. Reprod. Sci.* **2018**, *194*, 71–80, doi:10.1016/j.anireprosci.2018.03.024.
152. Roldan, E.R.S. Assessments of sperm quality integrating morphology, swimming patterns, bioenergetics and cell signalling. *Theriogenology* **2020**, doi:10.1016/j.theriogenology.2020.02.017.
153. Storey, B.T. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *Int. J. Dev. Biol.* **2008**, *52*, 427–437, doi:10.1387/ijdb.072522bs.
154. Martin-Hidalgo, D.; Bragado, M.J.; Batista, A.R.; Oliveira, P.F.; Alves, M.G. Antioxidants and Male Fertility: from Molecular Studies to Clinical Evidence. *Antioxidants* **2019**, *8*, 89, doi:10.3390/antiox8040089.
155. Ferramosca, A.; Zara, V. Bioenergetics of Mammalian Sperm Capacitation. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 902953, doi:10.1155/2014/902953.
156. Aitken, R.J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and

- pathological damage. *Mol. Reprod. Dev.* **2017**, *84*, 1039–1052, doi:10.1002/mrd.22871.
157. Aitken, R.J.; Baker, M.A.; Nixon, B. Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress? *Asian J. Androl.* **2015**, *17*, 633–639, doi:10.4103/1008-682X.153850.
158. Killian, G.J.; Chapman, D.A.; Kavanaugh, J.F.; Deaver, D.R.; Wiggin, H.B. Changes in phospholipids, cholesterol and protein content of oviduct fluid of cows during the oestrus cycle. *J. Reprod. Fertil.* **1989**, *86*, 419–426, doi:10.1530/jrf.0.0860419.
159. Aitken, R.J.; Harkiss, D.; Knox, W.; Paterson, M.; Irvine, D.S. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J. Cell Sci.* **1998**, *111*, 645–656.
160. Witte, T.S.; Schäfer-Somi, S. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* **2007**, *102*, 181–193.
161. Ruiz-Díaz, S.; Grande-p, S.; Arce-l, S.; Tamargo, C.; Olegario Hidalgo, C.; Pérez-Cerezales, S. Changes in the Cellular Distribution of Tyrosine Phosphorylation and Its Relationship with the Acrosomal Exocytosis and Plasma Membrane Integrity during In Vitro Capacitation of Frozen/Thawed bull spermatozoa. **2020**, doi:10.3390/ijms21082725.
162. Asano, A.; Nelson-Harrington, J.L.; Travis, A.J. Phospholipase B is activated in response to sterol removal and stimulates acrosome exocytosis in murine sperm. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 28104–28115, doi:10.1074/jbc.M113.450981.
163. Galantino-Homer, H.L.; Visconti, P.E.; Kopf, G.S. Regulation of Protein Tyrosine Phosphorylation during Bovine Sperm Capacitation by a Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate-Dependent Pathway1. *Biol. Reprod.* **1997**, *56*, 707–719, doi:10.1095/biolreprod56.3.707.
164. Betarelli, R.P.; Rocco, M.; Yeste, M.; Fernández-Novell, J.M.; Placci, A.;

- Azevedo Pereira, B.; Castillo-Martín, M.; Estrada, E.; Peña, A.; Zangeronimo, M.G.; et al. The achievement of boar sperm in vitro capacitation is related to an increase of disrupted disulphide bonds and intracellular reactive oxygen species levels. *Andrology* **2018**, *6*, 781–797, doi:10.1111/andr.12514.
165. Kadirvel, G.; Kathiravan, P.; Kumar, S. Protein tyrosine phosphorylation and zona binding ability of in vitro capacitated and cryopreserved buffalo spermatozoa. *Theriogenology* **2011**, *75*, 1630–1639, doi:10.1016/j.theriogenology.2011.01.003.
166. Bainbridge, D.R.J.; Catt, S.L.; Evans, G.; Jabbour, H.N. Successful in vitro fertilization of in vivo matured oocytes aspirated laparoscopically from red deer hinds (*Cervus elaphus*). *Theriogenology* **1999**, *51*, 891–898, doi:10.1016/S0093-691X(99)00036-9.
167. Buffone, M.G.; Wertheimer, E. V.; Visconti, P.E.; Krapf, D. Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **2014**, *1842*, 2610–2620, doi:10.1016/j.bbadis.2014.07.013.
168. García-Álvarez, O.; Maroto-Morales, A.; Ramón, M.; Del Olmo, E.; Jiménez-Rabadán, P.; Fernández-Santos, M.R.; Anel-López, L.; Garde, J.J.; Soler, A.J. Dynamics of sperm subpopulations based on motility and plasma membrane status in thawed ram spermatozoa incubated under conditions that support in vitro capacitation and fertilisation. *Reprod. Fertil. Dev.* **2014**, *26*, 725–732, doi:10.1071/RD13034.
169. Barbonetti, A.; Vassallo, M.R.C.; Cordeschi, G.; Venetis, D.; Carboni, A.; Sperandio, A.; Felzani, G.; Francavilla, S.; Francavilla, F. Protein tyrosine phosphorylation of the human sperm head during capacitation: Immunolocalization and relationship with acquisition of sperm-fertilizing ability. *Asian J. Androl.* **2010**, *12*, 853–861, doi:10.1038/aja.2010.52.
170. Flesch, F.M.; Wijnand, E.; van de Lest, C.H.A.; Colenbrander, B.; van Golde, L.M.G.; Gadella, B.M. Capacitation dependent activation of tyrosine phosphorylation generates two sperm head plasma membrane proteins with high primary binding affinity for the zona pellucida. *Mol. Reprod. Dev.* **2001**, *60*,

- 107–115, doi:10.1002/mrd.1067.
171. Sati, L.; Cayli, S.; Delpiano, E.; Sakkas, D.; Huszar, G. The pattern of tyrosine phosphorylation in human sperm in response to binding to zona pellucida or hyaluronic acid. *Reprod. Sci.* **2014**, *21*, 573–81, doi:10.1177/1933719113504467.
 172. Naz, R.K.; Ahmad, K.; Kumar, R. Role of membrane phosphotyrosine proteins in human spermatozoal function. *J. Cell Sci.* **1991**, *99*, 157–165.
 173. Cormier, N.; Bailey, J.L. A Differential Mechanism Is Involved During Heparin- and Cryopreservation-Induced Capacitation of Bovine Spermatozoa. *Biol. Reprod.* **2003**, *69*, 177–185, doi:10.1095/biolreprod.102.011056.
 174. Betarelli, R.P.; Rocco, M.; Yeste, M.; Fernández-Novell, J.M.; Placci, A.; Azevedo Pereira, B.; Castillo-Martín, M.; Estrada, E.; Peña, A.; Zangeronimo, M.G.; et al. The achievement of boar sperm in vitro capacitation is related to an increase of disrupted disulphide bonds and intracellular reactive oxygen species levels. *Andrology* **2018**, *6*, 781–797, doi:10.1111/andr.12514.
 175. De Lamirande, E.; San Gabriel, M.C.; Zini, A. Human sperm chromatin undergoes physiological remodeling during in vitro capacitation and acrosome reaction. *J. Androl.* **2012**, *33*, 1025–1035, doi:10.2164/jandrol.111.015982.
 176. Romanato, M.; Julianelli, V.; Zappi, M.; Calvo, L.; Calvo, J.C. The presence of heparan sulfate in the mammalian oocyte provides a clue to human sperm nuclear decondensation in vivo. *Hum. Reprod.* **2008**, *23*, 1145–1150, doi:10.1093/humrep/den028.
 177. Romanato, M.; Cameo, M.S.; Bertolesi, G.; Baldini, C.; Calvo, J.C.; Calvo, L. Heparan sulphate: A putative decondensing agent for human spermatozoa in vivo. *Hum. Reprod.* **2003**, *18*, 1868–1873, doi:10.1093/humrep/deg354.
 178. Grasa, P.; Cebrián-Pérez, J.Á.; Muiño-Blanco, T. Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation. *Reproduction* **2006**, *132*, 721–732, doi:10.1530/rep.1.00770.
 179. González-Fernández, L.; Macedo, S.; Lopes, J.S.; Rocha, A.; Macías-García, B.

- Effect of Different Media and Protein Source on Equine Gametes: Potential Impact During In Vitro Fertilization. *Reprod. Domest. Anim.* **2015**, *50*, 1039–1046, doi:10.1111/rda.12634.
180. Chaves, B.R.; Paula, A.; Pavaneli, P.; Blanco-prieto, O.; Pinart, E. Is exogenous bicarbonate required for boar sperm to elicit in vitro capacitation and subsequent progesterone-induced acrosome exocytosis? *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 1–24.
181. Harnal, V.K.; Spindler, R.; Monfort, S.L.; Pukazhenthil, B.; Bird, D.M.; Wildt, D.E. Sperm capacitation in vitro in the Eld's deer. *Theriogenology* **2001**, *56*, 399–413, doi:10.1016/S0093-691X(01)00572-6.
182. Gadella, B.M.; Tsai, P.S.; Boerke, A.; Brewis, I.A. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int. J. Dev. Biol.* **2008**, *52*, 473–480, doi:10.1387/ijdb.082583bg.
183. Macías-García, B.; Gonzalez-Fernandez, L.; Loux, S.C.; Rocha, A.M.; Guimarães, T.; Pena, F.J.; Varner, D.D.; Hinrichs, K. Effect of calcium, bicarbonate, and albumin on capacitation-related events in equine sperm. *Reproduction* **2015**, *149*, 87–99, doi:10.1530/REP-14-0457.
184. Yao, T.; Asayama, Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod. Med. Biol.* **2017**, *16*, 99–117.
185. Nang, C.F.; Osman, K.; Budin, S.B.; Ismail, M.I.; Jaffar, F.H.F.; Mohamad, S.F.S.; Ibrahim, S.F. Bovine serum albumin: Survival and osmolarity effect in bovine spermatozoa stored above freezing point. *Andrologia* **2012**, *44*, 447–453, doi:10.1111/j.1439-0272.2011.01203.x.
186. Takahashi, Y.; First, N.L. In vitro development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* **1992**, *37*, 963–978, doi:10.1016/0093-691X(92)90096-A.
187. Aitken, R.J.; Drevet, J.R. The importance of oxidative stress in determining the functionality of mammalian spermatozoa: A two-edged sword. *Antioxidants* **2020**, *9*.

188. Aitken, R.J.; Curry, B.J. Redox regulation of human sperm function: From the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxidants Redox Signal.* **2011**, *14*, 367–381, doi:10.1089/ars.2010.3186.
189. Mata-Campuzano, M.; Álvarez-Rodríguez, M.; del Olmo, E.; Fernández-Santos, M.R.; Garde, J.J.; Martínez-Pastor, F. Quality, oxidative markers and DNA damage (DNA) fragmentation of red deer thawed spermatozoa after incubation at 37 °C in presence of several antioxidants. *Theriogenology* **2012**, *78*, 1005–1019, doi:10.1016/j.theriogenology.2011.12.018.
190. Domínguez-Rebolledo, Á.E.; Fernández-Santos, M.R.; Bisbal, A.; Ros-Santaella, J.L.; Ramón, M.; Carmona, M.; Martínez-Pastor, F.; Garde, J.J. Improving the effect of incubation and oxidative stress on thawed spermatozoa from red deer by using different antioxidant treatments. *Reprod. Fertil. Dev.* **2010**, *22*, 856–870, doi:10.1071/RD09197.
191. Ravnik, S.E.; Albers, J.J.; Muller, C.H. A novel view of albumin-supported sperm capacitation: Role of Lipid Transfer Protein-I. *Fertil. Steril.* **1993**, *59*, 629–638, doi:10.1016/S0015-0282(16)55811-7.
192. Leahy, T.; Rickard, J.P.; Aitken, R.J.; De Graaf, S.P. Penicillamine prevents ram sperm agglutination in media that support capacitation. *Reproduction* **2016**, *151*, 167–177, doi:10.1530/REP-15-0413.
193. Pini, T.; De Graaf, S.P.; Druart, X.; Tsikis, G.; Labas, V.; Teixeira-Gomes, A.P.; Gadella, B.M.; Leahy, T. Binder of Sperm Proteins 1 and 5 have contrasting effects on the capacitation of ram spermatozoa. *Biol. Reprod.* **2018**, *98*, 765–775, doi:10.1093/biolre/i0y032.
194. Finkelstein, M.; Etkovitz, N.; Breitbart, H. Ca²⁺ signaling in mammalian spermatozoa. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2020**, *3*, 110–123, doi:10.1016/j.mce.2020.110953.
195. Bailey, J.L. Factors regulating sperm capacitation. *Syst. Biol. Reprod. Med.* **2010**, *56*, 334–348, doi:10.3109/19396368.2010.512377.

196. Reid, A.T.; Redgrove, K.; Aitken, R.J.; Nixon, B. Cellular mechanisms regulating sperm-zona pellucida interaction. *Asian J. Androl.* **2011**, *13*, 88–96, doi:10.1038/aja.2010.74.
197. Gervasi, M.G.; Visconti, P.E. Chang's meaning of capacitation: A molecular perspective. *Mol. Reprod. Dev.* **2016**, *83*, 860–874, doi:10.1002/mrd.22663.
198. Chen, Y.; Cann, M.J.; Litvin, T.N.; Iourgenko, V.; Sinclair, M.L.; Levin, L.R.; Buck, J. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science (80-.)*. **2000**, *289*, 625–628, doi:10.1126/science.289.5479.625.
199. Gadella, B.M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim. Reprod. Sci.* **2008**, *107*, 229–236, doi:10.1016/j.anireprosci.2008.05.006.
200. Leahy, T.; Gadella, B.M. New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane. *Asian J. Androl.* **2015**, *17*, 561–567, doi:10.4103/1008-682X.153309.
201. Demarco, I.A.; Espinosa, F.; Edwards, J.; Sosnik, J.; De la Vega-Beltrán, J.L.; Hockensmith, J.W.; Kopf, G.S.; Darszon, A.; Visconti, P.E. Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 7001–7009, doi:10.1074/jbc.M206284200.
202. J. Parrish, J. *Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH*; 1989; Vol. 41;.
203. Beltrán, C.; Treviño, C.L.; Mata-Martínez, E.; Chávez, J.C.; Sánchez-Cárdenas, C.; Baker, M.; Darszon, A. Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization. *Sperm Acrosome Biog. Funct. Dur. Fertil.* **2016**, *220*, 145–158, doi:10.1007/978-3-319-30567-7.
204. Kirichok, Y.; Navarro, B.; Clapham, D.E. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature* **2006**, *439*, 737–740, doi:10.1038/nature04417.
205. Locatelli, Y.; Cognié, Y.; Vallet, J.C.; Baril, G.; Verdier, M.; Poulin, N.; Legendre, X.; Mermillod, P. Successful use of oviduct epithelial cell coculture

- for in vitro production of viable red deer (*Cervus elaphus*) embryos. *Theriogenology* **2005**, *64*, 1729–1739, doi:10.1016/j.theriogenology.2005.04.002.
206. Chapman, S.; Keller, D.; Westhusin, M.; Drew, M.; Kraemer, D.. In vitro production of axis deer (*axis axis*) embryos, a preliminary study. *Theriogenology* **1999**, *51*, 280, doi:10.1016/s0093-691x(99)91839-3.
207. García-Álvarez, O.; Maroto-Morales, A.; Berlinguer, F.; Fernández-Santos, M.R.; Estesó, M.C.; Mermillod, P.; Ortiz, J.A.; Ramon, M.; Pérez-Guzmán, M.D.; Garde, J.J.; et al. Effect of storage temperature during transport of ovaries on in vitro embryo production in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Theriogenology* **2011**, *75*, 65–72, doi:10.1016/j.theriogenology.2010.07.011.
208. Sánchez-ajofrín, I.; Iniesta-cuerda, M.; Sánchez-calabuig, M.J.; Peris-frau, P.; Martín-maestro, A.; Antonio, J.; Fernández-santos, R.; Julián, J.; Gutiérrez-adán, A.; Josefa, A. Oxygen tension during in vitro oocyte maturation and fertilization affects embryo quality in sheep and deer. *Anim. Reprod. Sci.* **2020**, *213*, 106279, doi:10.1016/j.anireprosci.2020.106279.
209. Finkelstein, M.; Etkovitz, N.; Breitbart, H. Ca²⁺ signaling in mammalian spermatozoa. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2020**, *516*, 110953.
210. Grasa, P.; Cebrián-Pérez, J.Á.; Muiño-Blanco, T. Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation. *Reproduction* **2006**, *132*, 721–732, doi:10.1530/rep.1.00770.
211. Luconi, M.; Krausz, C.; Forti, G.; Baldi, E. *Extracellular Calcium Negatively Modulates Tyrosine Phosphorylation and Tyrosine Kinase Activity during Capacitation of Human Spermatozoa*; 1996; Vol. 55;.
212. Marquez, B.; Ignatz, G.; Suarez, S.S. Contributions of extracellular and intracellular Ca²⁺ to regulation of sperm motility: Release of intracellular stores can hyperactivate CatSper1 and CatSper2 null sperm. *Dev. Biol.* **2007**, *303*, 214–221, doi:10.1016/j.ydbio.2006.11.007.
213. Tardif, S.; Dubé, C.; Bailey, J.L. Porcine Sperm Capacitation and Tyrosine Kinase Activity Are Dependent on Bicarbonate and Calcium but Protein

- Tyrosine Phosphorylation Is Only Associated with Calcium¹. *Biol. Reprod.* **2003**, 68, 207–213, doi:10.1095/biolreprod.102.005082.
214. Gadella, B.; van Gestel, R. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. *Anim. Reprod. Sci.* **2004**, 82–83, 307–319, doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2004.04.030.
215. Vijayaraghavan, S.; Jo, M.; Fardilha, M. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility †. **2017**, 96, 2–12, doi:10.1095/biolreprod.116.144337.
216. Flesch, F.M.; Brouwers, J.F.H.M.; Nievelstein, P.F.E.M.; Verkleij, A.J.; Van Golde, L.M.G.; Colenbrander, B.; Gadella, B.M. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J. Cell Sci.* **2001**, 114, 3543–3555.
217. Liu, Y.; Wang, D.-K.; Chen, L.-M. The Physiology of Bicarbonate Transporters in Mammalian Reproduction¹. *Biol. Reprod.* **2012**, 86, 99–100, doi:10.1095/biolreprod.111.096826.
218. Wang, X.F.; Zhou, C.X.; Shi, Q.X.; Yuan, Y.Y.; Yu, M.K.; Ajonuma, L.C.; Ho, L.S.; Lo, P.S.; Tsang, L.L.; Liu, Y.; et al. Involvement of CFTR in uterine bicarbonate secretion and the fertilizing capacity of sperm. *Nat. Cell Biol.* **2003**, 5, 902–906, doi:10.1038/ncb1047.
219. Shi, Q.-X.; Roldan, E.R.S. Bicarbonate/CO₂ is not Required for Zona Pellucida- or Progesterone-Induced Acrosomal Exocytosis of Mouse Spermatozoa but is Essential for Capacitation¹. *Biol. Reprod.* **1995**, 52, 540–546, doi:10.1095/biolreprod52.3.540.
220. Soriano-Úbeda, C.; Romero-Aguirregomez-corta, J.; Matás, C.; Visconti, P.E.; García-Vázquez, F.A. Manipulation of bicarbonate concentration in sperm capacitation media improves in vitro fertilisation output in porcine species. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2019**, 10, 1–15, doi:10.1186/s40104-019-0324-y.
221. Muzzachi, S.; Guerra, L.; Martino, N.A.; Favia, M.; Punzi, G.; Silvestre, F.; Guaricci, A.C.; Roscino, M.T.; Stefania Muzzachi, L.; Pierri, C.L.; et al. Effect of cariporide on ram sperm pH regulation and motility: possible role of NHE1 ².

- Reproduction* **2018**, *155*, 433–445.
222. Gatti, J.; Chevrier, C.; Paquignon, M.; Dacheux, J.L. External ionic conditions, internal pH and motility of ram and boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **1993**, *98*, 439–449, doi:10.1530/jrf.0.0980439.
223. Vijayaraghavan, S.; Hoskins, D.D. Changes in the mitochondrial calcium influx and efflux properties are responsible for the decline in sperm calcium during epididymal maturation. *Mol. Reprod. Dev.* **1990**, *25*, 186–194, doi:10.1002/mrd.1080250212.
224. Martins, A.D.; Bernardino, R.L.; Neuhaus-Oliveira, A.; Sousa, M.; Sa, R.; Alves, M.G.; Oliveira, P.F. Physiology of Na⁺/H⁺ Exchangers in the Male Reproductive Tract: Relevance for Male Fertility. *Biol. Reprod.* **2014**, *91*, 1–6, doi:10.1095/biolreprod.114.118331.
225. Younis, A.I.; Zuelke, K.A.; Harper, K.M.; Oliveira, M.A.L.; Brackett, B.G. In Vitro Fertilization of Goat Oocytes1. *Biol. Reprod.* **1991**, *44*, 1177–1182, doi:10.1095/biolreprod44.6.1177.
226. D’Occhio, M.J.; Hengstberger, K.J.; Johnston, S.D. Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. *Anim. Reprod. Sci.* **2007**, *101*, 1–17.
227. Ramió-Lluch, L.; Fernández-Novell, J.M.; Peña, A.; Colás, C.; Cebrián-Pérez, J.A.; Muiño-Blanco, T.; Ramírez, A.; Concha, I.I.; Rigau, T.; Rodríguez-Gil, J.E. “In Vitro” Capacitation and Acrosome Reaction are Concomitant with Specific Changes in Mitochondrial Activity in Boar Sperm: Evidence for a Nucleated Mitochondrial Activation and for the Existence of a Capacitation-Sensitive Subpopulational Structure. *Reprod. Domest. Anim.* **2011**, *46*, 664–673, doi:10.1111/j.1439-0531.2010.01725.x.
228. Dubé, C.; Leclerc, P.; Baba, T.; Reyes-Moreno, C.; Bailey, J.L. The proacrosin binding protein, sp32, is tyrosine phosphorylated during capacitation of pig sperm. *J. Androl.* **2005**, *26*, 519–528, doi:10.2164/jandrol.04163.
229. González, R.; Sjunnesson, Y.C.B. Effect of blood plasma collected after

- adrenocorticotrophic hormone administration during the preovulatory period in the sow on oocyte invitro maturation. *Theriogenology* **2013**, *80*, 673–683, doi:10.1016/j.theriogenology.2013.06.017.
230. Rizos, D.; Ward, F.; Duffy, P.; Boland, M.P.; Lonergan, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.* **2002**, *61*, 234–248, doi:10.1002/mrd.1153.
231. Cormier, N.; Bailey, J.L. A Differential Mechanism Is Involved During Heparin- and Cryopreservation-Induced Capacitation of Bovine Spermatozoa. *Biol. Reprod.* **2003**, *69*, 177–185, doi:10.1095/biolreprod.102.011056.
232. Romanato, M.; Cameo, M.S.; Bertolesi, G.; Baldini, C.; Calvo, J.C.; Calvo, L. Heparan sulphate: A putative decondensing agent for human spermatozoa in vivo. *Hum. Reprod.* **2003**, *18*, 1868–1873, doi:10.1093/humrep/deg354.
233. Evenson, D.P.; Larson, K.L.; Jost, L.K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J. Androl.* **2002**, *23*, 25–43, doi:10.100.

ANEXOS

ANEXO I. Medios

Tabla 1.

Fluido oviductal sintético (mSOF) para la capacitación de semen de ciervo basado en Tervit et al. [106]. Salvo que indique lo contrario, la concentración está expresada en mM.

Componentes	Concentración
NaCl	108
KCl	7.16
KH ₂ PO ₄	1.2
CaCl ₂ 2H ₂ O	5
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.5
NaHCO ₃	25
Na lactato ^a	3.3
Piruvato	0.3
Glutamina	1
Penicilina	0.2
Rojo fenol (mg mL ⁻¹)	0.1
pH	7.2-7.4
mOsm	270-280

^a: g lactato=1.33 g mL⁻¹.

Tabla 2.

Fluido oviductal sintético (SOF) basado en el formulado por Tervit et al. [141] para la capacitación de semen de ovino, co-cultivo de gametos, cultivo *in vitro*, gradientes de Percoll[®] y elaboración de las tinciones de citometría. Salvo que indique lo contrario, la concentración está expresada en mM.

Componentes	Concentración
NaCl	108
KCl	7.16
KH ₂ PO ₄	1.2
CaCl ₂ 2H ₂ O	5
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.5
NaHCO ₃	25
Na lactato ^a	3.3
Piruvato	0.3
Glutamina	1
Aa esenciales	2
Aa no esenciales	1
Penicilina	0.2
Rojo fenol (mg mL ⁻¹)	0.1
pH	7.2-7.4
mOsm	270-280

^a: g lactato=1.33 g mL⁻¹.

Tabla 3.

Composición del medio TNE para la técnica de SCSA[®]. La concentración está expresada en mM.

Componentes	Concentración
Tris-HCl	10
NaCl	150
EDTA disódico	1
pH	7.4

Tabla 4.

Composición del detergente ácido para la técnica de SCSA[®]. Salvo que indique lo contrario, la concentración está expresada en mM.

Componentes	Concentración
HCl	80
NaCl	150
Triton X-100 (% (v/v))	0.1
pH	1.2

Tabla 5.

Composición del suero salino fisiológico para el transporte de ovarios. La concentración está expresada en mM.

Componentes	Concentración
NaCl	152.3
Penicilina	0.28

Tabla 6.

Composición de la solución salina fisiológica para la descongelación de las pajuelas en baños térmicos. La concentración está expresada en mM.

Componentes	Concentración
NaCl	152.3

Tabla 7.

Composición del medio TBS para su uso en la técnica de Western Blot. La concentración está expresada en mM.

Componentes	Concentración
--------------------	----------------------

TRIS	24.79
NaCl	150.06

Tabla 8.

Composición de los diferentes prototipos de medios de capacitación libres de suero evaluados. Salvo que indique lo contrario, la concentración está expresada en mM.

Medios estudio	CaCl ₂		NaHCO ₃	pH	
SF-Ca ²⁺	0-0.03-0.1-0.3-1-3-5		25	7.2-7.4	
SF-Bic	3		0-1-5-10-15-20-30	7.2-7.4	
SF-pH	3		30	5-6-7-8-9	
Componentes basales	NCAP	CAP	SF-Ca ²⁺	SF-Bic	SF-pH
NaCl	108	108	108	108	108
KCl	7.16	7.16	7.16	7.16	7.16
KH ₂ PO ₄	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Na lactato ^a	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3
Piruvato	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Glutamina	1	1	1	1	1
Penicilina	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Rojo fenol (mg mL ⁻¹)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Suplementos					
% ESS (v/v)	-	20	-	-	-
% PVA (p/v)	0.1	-	-	-	-
HEPES (mg mL ⁻¹)	2,35	2,35	2,35	2,35	2,35
pH	7.2-7.4	7.2-7.4	7.2-7.4	7.2-7.4	i.f.
MOsm	270-280	270-280	270-280	270-280	270-280

^a: ϱ lactato=1.33 g mL⁻¹.

i.f.: incluido en la formulación.

ANEXO II. Abreviaturas

- ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza de los espermatozoides.
- AMPc: adenosín monofosfato cíclico.
- CAP: control positivo de capacitación elaborado con fluido oviductal sintético ligeramente modificado de Tervit, 1972 [111].
- CAP-ESS: fluido oviductal sintético (Tervit, 1972) suplementado con 10 % ESS.
- CASA: sistemas computarizado de imágenes.
- CIV: capacitación *in vitro*.
- COCs: del inglés *cuulus oocyte-complex*, complejos cúmulus-ovocitos.
- d.p.i.: días post inseminación.
- DFI: del inglés *DNA fragmentation index*, índice de fragmentación del ADN.
- EDS: del inglés *estrous deer serum*, suero de cierva en celo.
- EEM: error estándar de la media.
- ESS: del inglés *estrous sheep serum*, suero de oveja en celo.
- FCS: del inglés *fetal calf serum* suero fetal bovino.
- FIV: fecundación *in vitro*.
- h.p.i.: horas post inseminación.
- HDS: del inglés *high green stainability*, grado de descondensación de la cromatina.
- IP: yoduro de propidio.
- LIN: índice de linealidad.
- MFI: del inglés *mean fluorescence intensities*, media de la intensidad de fluorescencia.
- MP: membrana plasmática.
- mSOF: fluido oviductal sintético ligeramente modificado del de Tervit, 1972 [111] (ver Anexo II. Medios).
- NCAP: control negativo de capacitación.
- OPU: del inglés *ovum pick-up*, recogida de ovocitos *in vivo*

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PIVE: producción *in vitro* de embriones

PKA: proteína quinasa A.

PVA: del inglés *polivinil alcohol*, alcohol de polivinilo

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real.

RA: reacción acrosómica.

ROS: del inglés *reactive oxygen species*. Especies reactivas de oxígeno.

RT: del inglés *reverse trascription*, transcripción inversa.

sAC: enzima adenil ciclasa soluble.

SCSA[®]: *Sperm Chromatin Structure Assay* [233].

SF: del inglés *serum-free*. Sin suero.

SF-Bic: medio de capacitación elaborado sin suero para el estudio del bicarbonato (3 mg mL⁻¹ BSA y 3 mM de Ca²⁺)

SF-Ca²⁺: medio de capacitación elaborado sin suero para el estudio del Ca²⁺ (3 mg mL⁻¹ BSA y 25 mM de NaHCO₃).

SF-pH: medio de capacitación elaborado sin suero para el estudio del pH (3 mg mL⁻¹ BSA, 3 mM de Ca²⁺ y 25 mM de NaHCO₃).

SF-CAP: SF del inglés *serum free*, medio de capacitación elaborado sin suero (3 mg mL⁻¹ BSA, 3 mM de Ca²⁺ y 25 mM de NaHCO₃ pH 7).

SOF: fluido oviductal sintético basado en Tervit, 1972 [111] elaborado sin BSA (ver Anexo I. Medios).

TM: motilidad total.

TRA: técnicas de reproducción asistida.

uds: unidades

VCL: velocidad según la trayectoria curvilínea

