



**Universidad**  
Zaragoza



Facultad de Ciencias  
**Universidad Zaragoza**

## Trabajo Fin de Grado

Efecto del fluido folicular de distintas fases del ciclo estral de la oveja sobre la quimiotaxis en espermatozoides ovinos

Effect of sheep follicular fluid from different stages of the estrous cycle on ram sperm chemotaxis

**Autora:**

Celia Martínez Saz

**Directoras:**

Rosaura Pérez Pé  
Sara Miguel Jiménez

Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular  
Curso 2020-2021 – Grado en Biotecnología  
BIOFITER Zaragoza  
(Biología, Fisiología y Tecnologías de la Reproducción).

## Índice

<b>1. Resumen</b> .....	1
<b>2. Abstract</b> .....	1
<b>3. Introducción</b> .....	2
3.1. Procesos experimentados por los espermatozoides .....	2
3.1.1. Capacitación .....	2
3.1.2. Hiperactivación flagelar .....	2
3.1.3. Unión a la zona pelúcida y reacción acrosómica .....	3
3.2. Fluido folicular y su composición .....	3
3.3. Mecanismos de orientación espermática: Quimiotaxis .....	4
3.3.1. Posibles agentes quimioatrayentes en el fluido folicular .....	4
3.3.2. Métodos de estudio de la quimiotaxis .....	5
<b>4. Hipótesis y objetivos</b> .....	7
<b>5. Materiales y métodos</b> .....	8
5.1. Obtención de las muestras seminales .....	8
5.2. Obtención de muestras de fluido folicular .....	8
5.3. Selección espermática: método de “swim-up/dextrano” .....	8
5.4. Cálculo de la concentración espermática .....	9
5.5. Inducción de la capacitación <i>in vitro</i> .....	9
5.6. Evaluación de las muestras espermáticas .....	10
5.6.1. Valoración de la motilidad espermática .....	10
5.6.2 Estudio de la integridad de la membrana plasmática: viabilidad .....	11
5.6.3. Análisis del estado de capacitación: tinción con clorotetraciclina (CTC) .....	12
5.7. Análisis de quimiotaxis .....	13
5.7.1. Preparación de muestras y carga en las cámaras de quimiotaxis .....	13
5.7.2. Análisis quimiotáctico mediante el Software Open Casa .....	14
5.8. Análisis estadísticos .....	15
<b>6. Resultados y discusión</b> .....	16
6.1. Evaluación de la calidad de las muestras espermáticas .....	16
6.1.1. Motilidad .....	16
6.1.2. Viabilidad (integridad de la membrana) .....	17
6.1.3. Estado de capacitación (CTC) .....	17
6.2. Estudio del posible efecto quimioatrayente del fluido folicular sobre los espermatozoides ovinos .....	18
<b>7. Conclusiones</b> .....	20
<b>8. Conclusions</b> .....	20
<b>9. Bibliografía</b> .....	21

## 1. Resumen

El fluido folicular conforma el entorno bioquímico en el que se desarrolla el ovocito hasta su ovulación y tiene una composición variable a lo largo del ciclo estral. Se libera junto con el ovocito tras la ovulación, y se postula que podría ejercer una función quimioatrayente, guiando a los espermatozoides hacia el ovocito. Esta capacidad quimiotáctica se ha demostrado en algunas especies de mamíferos, pero hasta el momento, no en la especie ovina. Para responder a este mecanismo de quimiotaxis parece necesario que los espermatozoides estén capacitados, es decir, que hayan sufrido una serie de cambios moleculares y bioquímicos que les confieren la capacidad fecundante.

Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides ovinos en presencia de fluido folicular de la oveja obtenido en distintas fases del ciclo estral y valorar la influencia del estado de capacitación espermática en la respuesta.

Para ello se utilizó fluido folicular ovino obtenido en las fases folicular y luteal tardía, a concentraciones de 2% y 10%. Se ensayaron sobre espermatozoides sin capacitar y capacitados *in vitro* en ausencia y presencia de agentes elevadores del AMPc, que disparan la capacitación en la especie ovina. Tras valorar la calidad de los espermatozoides (motilidad, viabilidad y estado de capacitación), se realizaron los ensayos de quimiotaxis utilizando cámaras IBIDI®  $\mu$ -Slide Chemotaxis y el análisis mediante el software open CASA.

Los resultados obtenidos demostraron que únicamente el fluido folicular de oveja obtenido en la fase luteal tardía, a ambas concentraciones ensayadas, es capaz de generar quimioatracción, pero solamente sobre los espermatozoides ovinos capacitados en presencia de elevadores del AMPc.

## 2. Abstract

The follicular fluid is the biochemical environment in which the oocyte develops until its ovulation, and its composition changes throughout the estrous cycle. The follicular fluid is released together with the oocyte, in the moment of ovulation, and it has been proposed as a chemoattractant for spermatozoa to localize the egg. This chemotactic ability has been demonstrated in some mammals, but, until date, no studies have been done in ovine. Also, it seems necessary that spermatozoa must be capacitated to respond to the chemotactic stimulus, that is that they had suffered some molecular and biochemical changes that confers them the fertilisation ability.

Therefore, the aim of this work was to study the chemotactic response of ovine sperm in presence of ovine follicular fluids, obtained at different stages of the estrous cycle, and to evaluate the influence of the sperm capacitation status in the chemotaxis mechanism.

To perform the experiments, ovine follicular fluids were obtained in the late follicular and luteal phases. Two fluid concentrations, 2% and 10%, were tested on non-capacitated and capacitated spermatozoa, without and with cAMP-elevating agents. After the sperm quality evaluation (motility, viability, and capacitation status), the chemotactic assays were carried out with the aim of the commercial device IBIDI®  $\mu$ -Slide Chemotaxis chamber.

The obtained results showed a chemotactic response of the spermatozoa capacitated in presence of cAMP-elevating agents to the late luteal-phase follicular fluid, at both tested concentrations.

## 3. Introducción

### 3.1. Procesos experimentados por los espermatozoides

Los gametos masculinos se producen en los testículos mediante el proceso de espermatogénesis. En la última fase, también denominada espermiogénesis, las espermátidas sufren una serie de cambios que finalmente darán lugar a la formación de los espermatozoides. Entre estos cambios se incluyen la condensación del núcleo, la formación del acrosoma a partir del aparato de Golgi, la reducción del citoplasma y el desarrollo del flagelo. Una vez formados, se produce la espermiación, o liberación de los espermatozoides al lumen de los túbulos seminíferos y, finalmente, su tránsito por el epidídimo, donde adquieren la motilidad y se producen en los últimos cambios a nivel de membrana, compactación del núcleo con protaminas y la eliminación de la gota citoplasmática (1). Es entonces cuando los espermatozoides estarán completamente maduros y listos para ser eyaculados. No obstante, la capacidad de fecundar el ovocito *in vivo* solo se produce tras su paso por el tracto genital femenino, en un proceso complejo denominado capacitación espermática (2).

#### 3.1.1. Capacitación

Tras la cópula o inseminación artificial (IA), los espermatozoides llegan al tracto reproductor femenino (TRF) y atraviesan el útero para, finalmente, depositarse en el istmo del oviducto. Una vez allí, los factores descapacitantes, aportados por las glándulas accesorias en el momento de la eyaculación, son eliminados y comienza el proceso de capacitación. Este proceso no se produce en todos los espermatozoides al mismo tiempo, sino en oleadas (3).

El término capacitación espermática se definió por primera vez en mamíferos como el intervalo de tiempo que los espermatozoides deben permanecer en el TRF antes de adquirir capacidad de fecundación (4-6). En este lapso, los espermatozoides experimentan un conjunto de cambios bioquímicos, metabólicos y estructurales, cuyo fin es la adquisición de capacidad fecundante por parte del gameto masculino (2). Concretamente, este proceso implica una serie de cambios en la membrana plasmática, como la salida de colesterol y el aumento de la fluidez de la misma y un incremento de iones intracelulares, como calcio y bicarbonato (7). Esto da lugar a la activación de la enzima adenilato ciclasa soluble (AC) (8), que fomenta la generación de AMPc y éste, a su vez, la activación de la proteína quinasa A (PKA) (vía AC/cAMP/PKA). La PKA da lugar a la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina (9), tanto en el flagelo, como en la cabeza del espermatozoide. Esta serie de eventos finalmente conducen a la hiperactivación flagelar (10) y a la reacción acrosómica (11).

#### 3.1.2. Hiperactivación flagelar

Durante la fase final de maduración de los espermatozoides en el tracto reproductor masculino, concretamente en el epidídimo, los espermatozoides adquieren la capacidad de movimiento por activación del batido flagelar. Presentan entonces un movimiento de avance rectilíneo, denominado motilidad activada, que les permitirá avanzar en el TRF tras la eyaculación (12, 13). Una vez allí, y tras sufrir el proceso de capacitación, se produce la hiperactivación flagelar, caracterizada por un aumento en el batido y flexión del flagelo. Por tanto, los espermatozoides pasan de avanzar rectilíneamente a realizar un movimiento caracterizado por una gran amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza y una trayectoria curvilínea (13)

Este proceso tiene un papel clave en la fecundación ya que potencia la habilidad de los espermatozoides para atravesar la mucosidad del oviducto y finalmente penetrar la matriz de células del *cumulus* y la zona pelúcida del ovocito (13).

La hiperactivación de la motilidad está relacionada principalmente con la fosforilación de proteínas específicas del flagelo, mediante la vía AC/AMPC/PKA mencionada anteriormente (14) y la entrada del ion  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales CatSper, unos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  específicos de los espermatozoides (15). Este ion es fundamental, ya que la actividad de las dineínas, que son las principales proteínas motoras de los microtúbulos del flagelo, está regulada por altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (16)

Finalmente, cabe destacar que se ha relacionado la hiperactivación flagelar con la quimiotaxis. De esta forma, algunos autores postulan que la hiperactivación se produciría de forma puntual e intermitente como mecanismo para captar el gradiente del compuesto quimioatrayente, y una vez detectado, el espermatozoide continuaría con el movimiento rectilíneo durante un tiempo (12).

### 3.1.3. Unión a la zona pelúcida y reacción acrosómica

La reacción acrosómica es un proceso fisiológico imprescindible para poder llevar a cabo la fecundación. Este proceso implica la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa del espermatozoide y la liberación de enzimas del acrosoma que le permitirán atravesar la zona pelúcida que rodea al ovocito (17). La reacción acrosómica se puede producir tanto de un modo espontáneo, por contacto con la zona pelúcida, como inducirla *in vitro* (18). En la zona pelúcida del ovocito se encuentran glicoproteínas de reconocimiento que interaccionan con la membrana del gameto masculino (proteína-proteína o carbohidrato-proteína), produciendo una cascada de transducción de señal dependiente de calcio (19).

Una vez tiene lugar la reacción acrosómica, el espermatozoide tiene la capacidad de atravesar la zona pelúcida con el fin de alcanzar el espacio perivitelino del ovocito. En ese momento se desencadenan una serie de mecanismos para evitar la poliespermia, como el cambio de potencial en la membrana del ovocito y el endurecimiento de la zona pelúcida, gracias a la liberación de enzimas provenientes de los gránulos del espacio perivitelino (20). Tras este proceso, se fusionan las membranas de ambos gametos para, finalmente, completar el proceso de fecundación (21).

## 3.2. Fluido folicular y su composición

El fluido folicular (FF) es un biofluido complejo en el que se desarrolla el ovocito previamente a la ovulación. El entorno biológico que conforma actúa como importante mediador en la comunicación entre las células del folículo antral y además se encarga de sustentar al ovocito. Por ello, es un elemento clave para que la fertilización del ovocito se lleve a cabo con éxito, desde la comunicación entre los gametos hasta el desarrollo de embriones viables (22).

El fluido folicular se considera un medio no definido respecto a los compuestos que lo forman. Sin embargo, se ha descrito que entre sus componentes se encuentran principalmente hormonas, enzimas, anticoagulantes, electrolitos y especies reactivas de oxígeno (ROS) relacionadas con la actividad metabólica de las células del folículo (22), así como exudados del suero sanguíneo (23). Entre las hormonas se encontrarían estrógenos (estradiol  $17\beta$ ), progesterona, testosterona, (24), inhibina (25) y melatonina (26, 27). A su vez, también se han encontrado iones (sodio, potasio, cloruro), y otros compuestos como glucosa,  $\beta$ -hidroxibutirato, lactato, urea, albúmina, ácidos grasos sin esterificar, colesterol (23, 28), factores de crecimiento y factores de tipo olfatorio y odorante producidos por el ovocito, y, según algunos autores, con capacidad quimioatrayente (29, 30). La composición del fluido folicular varía durante las distintas fases de desarrollo folicular a lo largo del ciclo estral en mamíferos (23). En el caso concreto de las hormonas esteroideas, la hormona predominante durante la fase folicular es el  $17\beta$ -estradiol ( $\text{E}_2$ ), secretado por los folículos en crecimiento, mientras que en la fase luteal, la hormona dominante es la progesterona ( $\text{P}_4$ ), secretada por el cuerpo lúteo (31).

### 3.3. Mecanismos de orientación espermática: Quimiotaxis

La orientación del espermatozoide es un proceso clave para su llegada al gameto femenino y se han descrito tres posibles mecanismos: termotaxis (32), reotaxis (33) y quimiotaxis (34), en la que se centra este trabajo. Cada uno de ellos produce una respuesta ante un estímulo diferente: gradiente de temperatura, flujo de fluido y gradiente de concentración de un quimioatrayente, respectivamente (35).

La quimiotaxis es un mecanismo por el cual el espermatozoide se orienta y desplaza hacia (quimioatracción) o en contra (quimiorepulsión) del gradiente de una sustancia quimiotáctica (30). En el caso de los animales marinos invertebrados, cuya fecundación es externa, está ampliamente demostrada la relación quimiotáctica entre el espermatozoide y el ovocito, y se conocen los agentes quimioatrayentes implicados, así como sus receptores en el espermatozoide y vías de señalización que se desencadenan (30). En cambio, la quimiotaxis espermática en mamíferos todavía presenta multitud de incógnitas. Esta ha sido estudiada en especies como el ser humano (36, 37), conejo (38), ratón (39), toro (40) y cerdo (41).

En el caso de especies no mamíferas el propósito del proceso de quimiotaxis es la atracción del mayor número de espermatozoides al ovocito, mientras que en mamíferos parece ser el reclutamiento de una población seleccionada de espermatozoides capacitados con anterioridad. En las especies en las que se ha estudiado, se ha observado que, únicamente los espermatozoides sometidos al proceso de capacitación, ya sea *in vitro* o *in vivo*, muestran una respuesta de quimioatracción ante los estímulos de gradiente de concentración (42). Como se ha comentado anteriormente, parece que existe una relación entre quimiotaxis e hiperactivación. Se cree que, antes de la detección de estímulos quimiotácticos, los espermatozoides presentan un movimiento de hiperactivación flagelar (35). Sin embargo, una vez localizado el gradiente del quimioatrayente, el espermatozoide se desplazaría del mismo modo que previamente a la hiperactivación, es decir de modo lineal y simétrico, para poder alcanzar al ovocito (12). Si se alejan del área de influencia de la sustancia quimioatrayente, volverían a exhibir el patrón de movimiento hiperactivado, hasta que localizan de nuevo la sustancia.

#### 3.3.1. Posibles agentes quimioatrayentes en el fluido folicular

Entre los compuestos que se postulan como agentes quimioatrayentes para los espermatozoides estarían las hormonas esteroideas, la melatonina y factores odorantes.

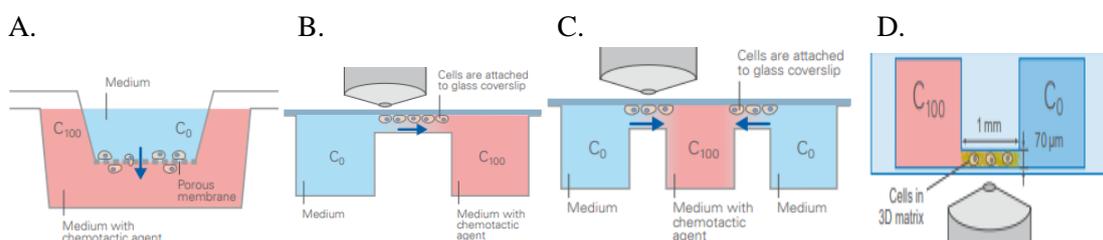
Las hormonas esteroideas, como la progesterona y el estradiol, tienen un importante papel en la regulación de los procesos reproductivos en mamíferos a través del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (43). Estas hormonas regulan la expresión génica tras su unión a receptores nucleares. Pero, aparte de esta acción genómica, las hormonas esteroideas también pueden ejercer efectos rápidos en varios tipos celulares por unión a receptores específicos en la membrana plasmática, activando rutas de transducción de señales (44). Recientemente, se ha descrito la presencia de receptores de membrana en espermatozoides ovinos para la progesterona y el 17- $\beta$  estradiol en la región ecuatorial y en la pieza intermedia. Además, se ha observado que estos receptores cambian de localización tras la capacitación *in vitro* (45). La unión de las hormonas esteroideas a sus respectivos receptores da lugar a efectos no genómicos sobre la funcionalidad espermática ovina (motilidad progresiva, capacitación y reacción acrosómica) (46). En cuanto a su papel quimioatrayente, nuestro grupo de investigación ha realizado ensayos de quimiotaxis con ambas hormonas que apuntan a una posible acción quimiotáctica sobre espermatozoides ovinos (datos no publicados). La acción quimioatrayente de la progesterona se ha descrito en espermatozoides de otras especies, como conejo y humano (38, 47), pero no así la del estradiol.

La melatonina es una hormona derivada del aminoácido triptófano, y está implicada en multitud de procesos fisiológicos y fisiopatológicos, entre otros, procesos relacionados con la reproducción estacional en mamíferos y los ritmos circadianos (48). Además, tiene una clara acción antioxidante, evitando el daño oxidativo en macromoléculas, células, tejidos y órganos. Esta hormona es sintetizada principalmente durante la noche por la glándula pineal (48, 49). Pero también se sintetiza melatonina en otros tejidos extrapineales (50) como por ejemplo el tracto gastrointestinal (51), o el tracto reproductor masculino (52) y femenino de algunos mamíferos. Cabe destacar que la melatonina está presente también en el plasma seminal (53), y en el fluido folicular (27) alcanzando incluso concentraciones superiores a las del suero sanguíneo. Por tanto, los espermatozoides están expuestos a diferentes concentraciones de melatonina primero en el tracto reproductor masculino, y luego en el femenino. El grupo de investigación en el que se ha realizado el presente trabajo observó que la melatonina, añadida *in vitro* a los espermatozoides ovinos, tiene un efecto modulador sobre la capacitación espermática (54), además de producir un descenso del daño oxidativo, ya que disminuye los niveles de ROS (55). Además, se ha descrito la presencia de receptores de membrana para melatonina (MT1 y MT2) en espermatozoides ovinos (56), y demostrado que, parte de estas acciones se llevan a cabo a través de su unión a los mismos (57). En cuanto a su posible acción quimioatrayente, se ha descrito su efecto sobre algunas células somáticas como neutrófilos (58), pero, hasta la fecha no existen evidencias sobre su acción sobre espermatozoides.

Finalmente, los factores odorantes poseen receptores en muchos tejidos, no solo en el epitelio respiratorio (59). Se ha demostrado que estos factores pueden producir quimiotaxis espermática mediante la activación de una vía de transducción olfatoria tras la unión a su receptor (30, 60), como el hOR17-4 en el caso la especie humana (60). Además, estos factores están asociados con procesos como la espermatogénesis, maduración, capacitación, motilidad y fertilización. No obstante, todavía quedan muchas incógnitas en cuanto al mecanismo de acción y la implicación de los odorantes en la funcionalidad espermática. (61).

### 3.3.2. Métodos de estudio de la quimiotaxis

Para llevar a cabo el estudio de quimiotaxis existen diferentes tipos de dispositivos que se han ido desarrollando y mejorando a lo largo de los años. El primero utilizado fue la cámara Boyden, y posteriormente las cámaras Zigmond, Dunn y, la usada en este trabajo, IBIDI®  $\mu$ -Slide Chemotaxis (Fig.1).



**Figura 1. Representación gráfica de los principales dispositivos de quimiotaxis.** Cámara Boyden (A), cámara Zigmond (B), cámara Dunn (C) y cámara ibidi  $\mu$ -Slide Chemotaxis (D).

Imágenes adaptadas de: [https://ibidi.com/img/cms/resources/AG/FL\\_AG\\_035\\_Chemotaxis\\_150dpi.pdf](https://ibidi.com/img/cms/resources/AG/FL_AG_035_Chemotaxis_150dpi.pdf)

La cámara Boyden, en un principio fue diseñada para el estudio de la quimiotaxis en leucocitos. Este dispositivo consiste en dos compartimentos separados por una membrana por la que únicamente pasan las células con capacidad de migración de un compartimento a otro. El recuento de estas células se realiza en la membrana. El gradiente químico que se establece es escalonado y hay una distribución no homogénea al inicio del ensayo (62, 63).

En cuanto a la cámara Zigmond, fue usada por primera vez en leucocitos polimorfonucleares. Las células crecen y migran en un cristal en el puente entre los dos reservorios. El gradiente químico en este caso es lineal y la distribución celular previa es homogénea; sin embargo, no mantiene la estabilidad en un tiempo prolongado (64).

La cámara Dunn es similar a la anterior; también tiene definido un gradiente lineal, la distribución inicial es homogénea, pero la estabilidad a largo plazo es mayor que en la cámara Zigmond. Asimismo, esta cámara consigue una mayor precisión dimensional y presenta mejores características ópticas. Se trata de un portaobjetos con dos pocillos concéntricos separados por un puente. Se ha usado para el estudio de fibroblastos (65), y nuestro grupo de investigación también la ha usado para espermatozoides (66, 67).

Finalmente, la cámara IBIDI® *μ-Slide Chemotaxis* usada en este estudio, se emplea para analizar el movimiento y migración de distintos tipos de células, rápidas o lentas, adherentes o no adherentes, por medio de un puente que conecta dos reservorios. Se establece un gradiente químico lineal a largo plazo en uno de los reservorios y permite analizar con detalles la migración de las células en estudio. A pesar de que sirve para varios tipos de células, principalmente se ha usado en estudios de células de migración lenta. Sin embargo, se ha empezado a emplear para células con mayor capacidad de migración obteniéndose buenos resultados (68, 69), por lo que fue la elegida para llevar a cabo el presente trabajo.

Además de estas cámaras, se están creando nuevos dispositivos empleando la microfluídica para mejorar los ensayos tanto de quimiotaxis como de termotaxis en gametos masculinos (70)

Antiguamente el análisis quimiotáctico se realizaba mediante la grabación de las muestras y posterior trazado manual de la trayectoria de los espermatozoides (71). En 1989 apareció por primera vez un sistema de análisis espermático automatizado (72). No obstante, el desarrollo de nuevos *softwares* para el análisis de las trayectorias celulares en la cámaras de quimiotaxis, como los sistemas CASA (*Computer-assisted sperm analysis*) han facilitado el análisis de los datos obtenidos en las grabaciones (73). El grupo de investigación donde se ha llevado a cabo el presente trabajo desarrolló un *software* libre llamado OpenCASA que, además de analizar los parámetros de calidad seminal (motilidad, morfología y viabilidad), presenta un módulo específico para el análisis de quimiotaxis (*Chemotaxis module*) que proporciona información sobre el comportamiento quimiotáctico mediante dos índices: Ch (de *Chemotactic index*) y SL (de *Straight Line index*) (74).

## 4. Hipótesis y objetivos

Existen numerosos estudios sobre el fenómeno de quimiotaxis en células somáticas y en espermatozoides de animales de fecundación externa, sin embargo, los llevados a cabo con espermatozoides de mamíferos son escasos. Hasta el momento, se ha descrito cierta respuesta quimiotáctica hacia el fluido folicular en espermatozoides de algunas especies como humano (36, 37), conejo (38), ratón (39), bovino (40) o porcino (41). No obstante, no existen trabajos publicados en la especie ovina. En muchos de estos estudios se ha observado que solamente los espermatozoides que han sufrido el proceso de capacitación, ya sea *in vivo* o *in vitro*, son capaces de responder ante un estímulo quimiotáctico (75).

Partiendo de estos antecedentes, la hipótesis planteada en este trabajo fue que el fluido folicular completo de oveja podría generar una respuesta de quimioatracción sobre los espermatozoides ovinos dependiendo del estado de capacitación de los mismos, la fase del ciclo estral en la que se recoge el fluido folicular, así como la concentración empleada.

Por todo ello, los objetivos planteados en este trabajo fueron:

1. El estudio del posible efecto quimiotáctico del fluido folicular de oveja, recogido en las fases folicular y luteal tardías, sobre los espermatozoides ovinos.
2. La determinación del grado de respuesta quimiotáctica en función del estado de capacitación en el que se encuentren los espermatozoides ovinos.
3. La evaluación de la influencia de la concentración de fluido folicular de oveja en la acción quimiotáctica sobre los espermatozoides ovinos.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1. Obtención de las muestras seminales

Las muestras seminales utilizadas para la realización de los experimentos se obtuvieron a partir de moruecos adultos (2-4 años de edad) de la raza *Rasa aragonesa* estabulados en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

Las extracciones fueron llevadas a cabo desde noviembre de 2020 hasta abril de 2021 por el personal del SEA, mediante vagina artificial. Se obtuvieron dos eyaculados consecutivos de cada morueco y se trabajó con la mezcla de segundos eyaculados con el fin de evitar diferencias individuales y porque está demostrado que los espermatozoides del segundo eyaculado tienen mejores parámetros de calidad que los del primero (76). Tras la recogida, las muestras se mantuvieron atemperadas a 37 °C hasta su uso en el laboratorio.

### 5.2. Obtención de muestras de fluido folicular

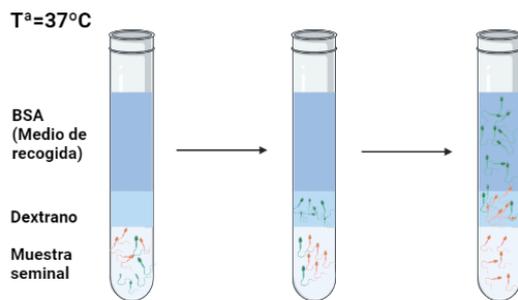
Las muestras de fluido folicular utilizadas en este Trabajo de Fin de Grado fueron cedidas amablemente por el Grupo de Investigación de Fisiología de la Reproducción de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia.

Las muestras procedentes de varias ovejas se obtuvieron en distintas fases del ciclo estral. En este trabajo se emplearon muestras procedentes de la fase folicular tardía (FFT) y fase luteal tardía (FLT) debido a que podían presentar mayor variación en su composición, sobre todo en la concentración de las hormonas presentes en las diferentes fases. Las muestras se conservaron congeladas a -80 °C hasta su uso.

### 5.3. Selección espermática: método de “swim-up/dextrano”

El semen está formado tanto por los espermatozoides como por el plasma seminal, un conjunto de secreciones procedentes mayoritariamente de las glándulas sexuales accesorias. A pesar de jugar un papel importantísimo en la funcionalidad espermática, el contacto prolongado con el plasma seminal produce efectos perjudiciales en algunos parámetros de calidad seminal, como la motilidad y la viabilidad (77, 78). Además, el plasma seminal contiene hormonas y otras sustancias en su composición que podrían alterar los resultados experimentales. Por ello, es necesaria la separación de los espermatozoides del plasma seminal, y en este trabajo se llevó a cabo mediante el método de *swim-up/dextrano*. Esta técnica se desarrolló para espermatozoides humanos como alternativa a la centrifugación, ya que causaba efectos dañinos sobre las células espermáticas (77) y, posteriormente se adaptó para espermatozoides ovinos (78)

El método *swim-up/dextrano* es un método de lavado y selección espermática, puesto que permite la obtención de una muestra enriquecida en espermatozoides con alta viabilidad y motilidad, sin la presencia del plasma seminal. El fundamento de esta técnica consiste en que únicamente los espermatozoides con buena motilidad son capaces de nadar y atravesar la capa intermedia enriquecida en dextrano que se deposita sobre ellos y les dificulta el movimiento. Además, los espermatozoides con la membrana alterada quedan retenidos en esa capa. Por ello, en la fase de recogida encontraremos una mayor proporción de espermatozoides móviles y viables, libres de plasma seminal (Fig. 2).



**Figura 2. Representación gráfica de la técnica *swim-up/dextrano*.** En verde representados los espermatozoides viables; en rojo los no viables. Fuente: Imagen creada con BioRender.com <https://biorender.com>

El medio usado en este método de selección espermática es el mHTF (*modified Human Tubular Fluid Medium*) adaptado a la especie ovina. Su composición es la siguiente: NaCl 50 mM, KCl 10 mM, MgSO<sub>4</sub> (anhidro) 0,4 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 mM, HEPES 21 mM, glucosa 2,8 mM, piruvato sódico 0,3 mM, lactato sódico 18,6 mM y sacarosa 200 mM (pH 6,5). A partir de él, se preparan dos medios: mHTF-BSA o medio de recogida (5 mg albúmina sérica bovina (BSA)/ml mHTF) y mHTF-dextrano (30 mg dextrano/ml mHTF).

Para llevar a cabo el proceso se depositaron 500 µL de semen fresco en la base un tubo de ensayo con base redondeada de 15 mm de diámetro y encima se colocaron suavemente 500 µL de mHTF-dextrano, sin mezclar las fases. Finalmente, se depositaron 1,5 mL de mHTF-BSA, y se incubaron 15 minutos dentro de una estufa a 37 °C. Tras la incubación, se recogieron 750 µL del sobrenadante de la fase superior y se renovó ese volumen con 750 µL de mHTF-BSA. Se repitió este proceso 3 veces más, obteniendo un total de cuatro sobrenadantes, y se descartó el primero por poder contener todavía restos de plasma seminal. Finalmente, se homogenizó la mezcla de los otros tres sobrenadantes, siendo esta la muestra de espermatozoides seleccionados.

#### 5.4. Cálculo de la concentración espermática

La concentración espermática en la muestra se determinó usando una cámara de Neubauer. En moruecos, la concentración de espermatozoides en el eyaculado varía entre  $3\text{-}7 \times 10^9$  cél/mL.

La muestra obtenida por *swim-up* se diluyó 1/100 (v/v) con agua para lograr la inmovilización de los espermatozoides y permitir su recuento. Se colocó una gota de 8 µL de dicha dilución en la cámara de Neubauer por capilaridad con la ayuda de una micropipeta. El recuento se llevó a cabo usando un microscopio óptico Nikon eclipse 50i de contraste de fases (Nikon Eclipse 50i; Nikon, Tokyo, Japón), con el objetivo de 10 aumentos (100x aumentos totales). Tras el recuento, se calculó la concentración de la muestra seleccionada mediante la fórmula:

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{cél}}{\text{ml}} \right) = n^{\circ} \text{ de células contadas} \times 10^4 \times \frac{1}{\text{Dilución}}$$

#### 5.5. Inducción de la capacitación *in vitro*

Como algunos autores habían descrito previamente que sólo los espermatozoides capacitados eran capaces de mostrar una respuesta quimiotáctica (30, 36), en el presente trabajo se indujo la capacitación espermática *in vitro* de los espermatozoides ovinos para estudiar y comparar el efecto quimiotáctico del fluido folicular tanto en muestras capacitadas como no capacitadas.

Para la inducción de la capacitación *in vitro*, las muestras obtenidas por la técnica de *swim-up/dextrano*, se diluyeron hasta una concentración de  $1,6 \times 10^8$  células/mL en medio TALP. Este medio está compuesto por NaCl 100 mM, KCl 3,1 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 25 mM, ácido láctico 0,3 mM, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 21,6 mM, HEPES 3 mM, ácido pirúvico 0,4 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 3 mM y BSA 5mg/mL, pH=7,3. Este medio se usa para la inducción de la capacitación *in vitro*

en numerosas especies, pero la especie ovina es particularmente difícil de capacitar debido a sus bajos niveles de AMPc. Por ello, para capacitar espermatozoides ovinos *in vitro* se requiere de la adición de una serie de sustancias que disparan este proceso, ya que incrementan el AMPc asegurando de este modo la capacitación (79). A la mezcla de estas sustancias se le denominó *cocktail* (CK), e incluye: db-AMPc 1 mM, cafeína 1 mM, teofilina 1 mM, ácido okadaico 0,2  $\mu$ M y metil- $\beta$ -ciclodextrinas (MBCD) 2,5 mM. A las muestras incubadas en medio TALP se les denominó muestras cap-TALP y a las incubadas en medio TALP con elevadores del AMPc, muestras cap-CK.

Para una correcta capacitación *in vitro* se necesita incubar a los espermatozoides en estufas que simulen las condiciones del interior del tracto reproductor femenino. En este caso, se incubaron ambos tipos de muestras en alícuotas de 500 $\mu$ L ( $1,6 \times 10^8$  espermatozoides/ml) a 39 °C, con un 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad del 100%, manteniendo los tubos abiertos para permitir el intercambio gaseoso. Normalmente esta incubación se alarga hasta 3 horas, pero a partir de la segunda hora, los espermatozoides comienzan a aglutinarse, lo que dificulta su movimiento y, por tanto, el estudio de la quimiotaxis. Por esta razón, en este trabajo la incubación sólo se llevó a cabo durante dos horas.

## 5.6. Evaluación de las muestras espermáticas

Previamente a la realización de los ensayos de quimiotaxis, se valoró la motilidad, la integridad de la membrana espermática y el estado de capacitación, tanto de las muestras *swim-up*, como de las capacitadas (cap-TALP y cap-CK).

### 5.6.1. Valoración de la motilidad espermática

Para la valoración de la motilidad espermática se empleó un sistema de análisis computarizado, el cual se denomina genéricamente CASA (*Computer Assisted Semen Analysis*). Concretamente, se usó el *software* libre OpenCASA, creado por el grupo en el que se realiza el presente trabajo (74), y una cámara de vídeo (acA1920-155uc, Basler, Exton, PA, EE. UU.) conectada a un microscopio óptico con contraste de fases (Nikon Eclipse 50i; Nikon, Tokyo, Japón). Este microscopio estaba equipado con una platina térmica para mantener las muestras a la temperatura óptima mientras se analizaron, usando el objetivo de 10X (100x aumentos totales).

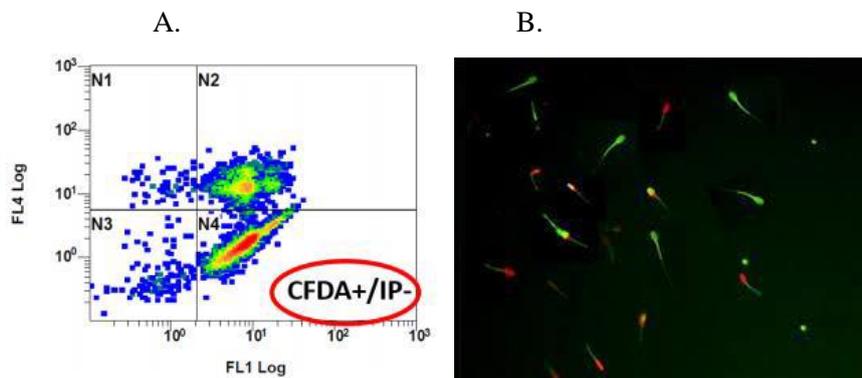
Con relación a la preparación de las muestras para llevar a cabo este análisis, fue necesario diluirlas a  $3 \times 10^7$  cél/mL para que el programa analizase correctamente las trayectorias de los espermatozoides. Las muestras *swim-up* se diluyeron 1/10 y las capacitadas 1/2 (v/v) en medio mHTF. Se colocó una gota de 10  $\mu$ L entre un portaobjetos y un cubreobjetos atemperados a 37 °C y se analizaron 5 campos por cada muestra para obtener un resultado representativo de las mismas. El programa analiza la trayectoria de los espermatozoides y los clasifica atendiendo a su motilidad y velocidad. Los parámetros que se analizaron fueron la motilidad total (porcentaje de espermatozoides que se mueven) y la motilidad progresiva (porcentaje de espermatozoides que se desplazan siguiendo una trayectoria rectilínea sobre el total de espermatozoides móviles).

### 5.6.2 Estudio de la integridad de la membrana plasmática: viabilidad

La integridad de la membrana plasmática, es decir, la viabilidad, se evaluó mediante una doble tinción con dos fluorocromos: yoduro de propidio (IP) y diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) (80).

El diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) es un compuesto incoloro y poco ionizado, por lo que es capaz de penetrar en todas las células por difusión a través de la membrana. Una vez dentro de ellas, las esterasas intracelulares lo hidrolizan produciendo acetato de carboxifluoresceína, el cual emite fluorescencia verde. Este compuesto está altamente ionizado, por tanto, no es capaz de atravesar la célula en el caso de que su membrana estuviese intacta y queda retenido dentro de ella. Así, los espermatozoides viables que presenten metabolismo activo y membrana intacta aparecerán de color verde bajo la iluminación fluorescente. Por otro lado, el yoduro de propidio (IP) es un colorante nuclear que sólo penetra en aquellas células con membrana dañada, uniéndose a su DNA y tiñendo de rojo la cabeza del espermatozoide (Fig. 3.B).

Se puede llevar a cabo la determinación de la viabilidad usando un microscopio de fluorescencia o un citómetro de flujo. En estos experimentos se usó un citómetro de flujo, el cual hace pasar las células teñidas de una en una a través de un capilar y, al incidir un láser sobre ellas, aporta información sobre su coloración y, por tanto, sobre el estado de su membrana.



**Figura 3. A)** Imagen representativa de las diferentes poblaciones de espermatozoides obtenidas por citometría de flujo (fotodetectores FL1 y FL4) tras la tinción con CFDA/IP: espermatozoides no viables en el cuadrante superior derecho y los viables en el inferior derecho. **B)** Imagen representativa de la tinción con CFDA/IP evaluada con microscopio óptico de fluorescencia y con filtro de excitación de 450-490 nm. Objetivo 40X. En ella se aprecian los espermatozoides con la membrana intacta teñidos de verde, los que tienen la membrana dañada teñidos de rojo, y en amarillo y rojo a los que tienen la membrana plasmática dañada y la acrosomal intacta. Fuente: “Manejo reproductivo ovino” (81)

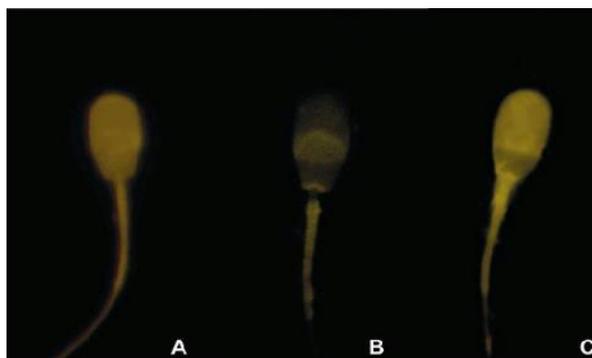
Para esta tinción, las muestras se diluyeron en medio mHTF (1/60 las de *swim-up* y 1/30 las capacitadas, v/v) y se añadieron 3  $\mu$ L de CFDA (1 mM), 3  $\mu$ L de IP (1,5 mM) y 3  $\mu$ L de formaldehído, que actúa como fijador (0,5% v/v). Tras su incubación a 37 °C, 10 minutos en oscuridad, se analizaron con un citómetro de flujo FC 500 (Beckman Coulter INC., Pasadena, CA, EE. UU.), que dispone de un láser de argón de 488 nm. En cuanto a los filtros del citómetro, se utilizaron FL1-525  $\pm$  5 nm y FL4-675  $\pm$  5 nm, para CFDA y IP, respectivamente. El citómetro evaluó 20.000 eventos (espermatozoides individuales) en cada muestra, y se tuvieron en cuenta los espermatozoides viables (CFDA+/IP-) (Fig. 3.A).

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

El estado de capacitación se estudió mediante tinción con clorotetraciclina (CTC). La CTC es un antibiótico capaz de penetrar en las células espermáticas, donde se une al calcio intracelular, dando lugar a diferentes patrones de fluorescencia amarilla que varían en función de donde se encuentre este catión divalente, y que se relacionan con su estado de capacitación (82). La técnica fue puesta a punto en ratón (82), y validada posteriormente para la especie ovina (83). Tras la tinción, bajo el microscopio de fluorescencia se distinguen: espermatozoides no capacitados, con cabeza uniformemente fluorescente; espermatozoides capacitados, con fluorescencia en la mitad anterior de la cabeza y sin fluorescencia en la mitad posterior; y espermatozoides que han sufrido la reacción acrosómica, sin nada de fluorescencia o sólo una banda en el segmento ecuatorial de la cabeza (Fig. 4).

La solución de trabajo de CTC se preparó cada día, a una concentración de 750  $\mu\text{M}$  de clorotetraciclina (Sigma-Aldrich) diluida en un tampón compuesto por NaCl 130 mM, TRIS 20 mM y DL-cisteína 5  $\mu\text{M}$ , ajustando el pH a 7,8 y filtrándolo a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  de poro. Una vez preparada la solución, se agitó durante 30 minutos aproximadamente en un balancín, siempre en oscuridad, y se conservó en nevera hasta su uso. Para la tinción se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de la solución de tinción CTC a las muestras 1:1 (v/v). Para fijar la preparación, se utilizaron 5  $\mu\text{L}$  de una dilución 1,25 % p/v de paraformaldehído en tampón TRIS-HCl 0,5 M. Las muestras así preparadas se incubaron como mínimo 30 minutos a 4  $^{\circ}\text{C}$  antes de realizar el montaje para su visualización al microscopio. Para ello, en primer lugar se colocó una gota de 3  $\mu\text{L}$  de DABCO (1,4-diazabicyclo [2.2.2]octano) 0,22 M (en solución de Glicerol:PBS (9:1 v/v)) en un portaobjetos, para la conservación adecuada de la fluorescencia, y sobre ella se depositaron 10  $\mu\text{L}$  de la muestra teñida previamente con clorotetraciclina. Tras mezclar las gotas, se colocó un cubreobjetos, se retiró el exceso de DABCO, y se selló con esmalte sintético para evitar la desecación. Una vez finalizada la preparación se conservó a -20  $^{\circ}\text{C}$  en oscuridad hasta su visualización.

Las preparaciones fueron analizadas mediante un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E-400. Se utilizó un filtro V-2A de 420- 490 nm de excitación y 510 nm de emisión. Se evaluaron a 1000x aumentos totales utilizando un objetivo de inmersión, y se evaluaron un mínimo de 100 espermatozoides de cada una de las preparaciones, diferenciando entre capacitados, no capacitados y los que han sufrido la reacción acrosómica.



**Figura 4.** Patrones de tinción con CTC en espermatozoides. El patrón A es indicativo de que el espermatozoide no está capacitado (NC); el patrón B únicamente muestra fluorescencia en la región ecuatorial, indicativo de reacción acrosómica (R); el patrón C muestra fluorescencia en la mitad acrosomal de la cabeza, indicativo de capacitación (C).

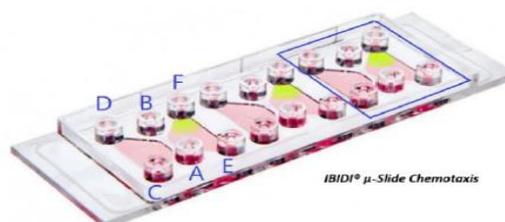
Fuente: (Tejeiro, 2010) (84).

## 5.7. Análisis de quimiotaxis

Se evaluaron tres grupos experimentales: espermatozoides obtenidos tras un proceso de *swim-up* y espermatozoides procedentes de *swim-up* y capacitados *in vitro* en medio TALP sin (cap-TALP) y con agentes elevadores del AMPc o *cocktail* (cap-CK).

### 5.7.1. Preparación de muestras y carga en las cámaras de quimiotaxis

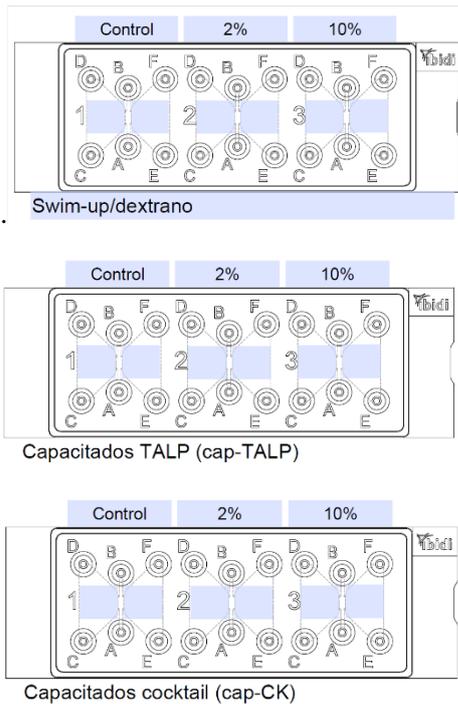
Los dispositivos usados para valorar el posible efecto quimiotáctico de los dos fluidos foliculares (de fase folicular tardía (FFT) y de fase luteal tardía (FLT)) fueron las IBIDI®  $\mu$ -Slide Chemotaxis, que presentan 3 cámaras independientes. En cada dispositivo, se emplearon dos de las cámaras para ensayar el fluido folicular a dos concentraciones (2% y 10 % FF (v/v) respectivamente), y la tercera se utilizó para el control, sin añadir fluido folicular. Cada cámara está constituida por 2 reservorios unidos entre sí mediante un puente (segmento AB en la figura 5). Los dispositivos se atemperaron previamente a 37 °C y se utilizó un dispositivo para cada grupo experimental (*swim-up*, cap-TALP y cap-CK). En el puente central (AB) se inyectaron a través del orificio A 6  $\mu$ L de medio mHTF-BSA con espermatozoides a una concentración de  $2,5 \times 10^6$  cél/mL, y sin soltar la pipeta se aspiró el mismo volumen por el orificio B para un correcto llenado del puente. En cada uno de los reservorios (CD y EF) se cargaron 65  $\mu$ L de la muestra a estudiar a la misma concentración ( $2,5 \times 10^6$  cél/mL), en medio mHTF-BSA. La razón del uso de este medio con BSA es la prevención de la aglutinación celular, ya que, si los espermatozoides se aglutinasen, no podrían moverse libremente, por lo que las trayectorias quimiotácticas no serían las reales, pudiendo alterar los resultados de los ensayos.



**Figura 5. Dispositivo IBIDI®  $\mu$ -Slide Chemotaxis**, en la que se han identificado los distintos orificios (A, B, C, D, E, F) por los que se introducen las soluciones o medios para el ensayo, y se ha remarcado en azul una de las tres cámaras independientes de análisis quimiotáctico del dispositivo. Se ha simulado en color verde el gradiente químico que se establecería al inyectar desde F, la potencial sustancia quimiotáctica, en este caso fluido folicular. Fuente: imagen adaptada de ibidi.com (2021)

<https://ibidi.com/channel-slides/9--slide-chemotaxis-ibitreat.html>

A uno de los reservorios que contenía 65  $\mu$ L de medio mHTF-BSA junto con los espermatozoides (en este caso el EF), se le añadieron (a través del orificio F) 30  $\mu$ L de una dilución que contenía fluido folicular del tipo y la concentración estudiada en cada caso, junto con los espermatozoides y el medio. Esta adición se realizó en dos veces; primero se cargaron 15  $\mu$ L y se aspiró el mismo volumen por el orificio E y seguidamente se volvieron a cargar otros 15  $\mu$ L para establecer un gradiente. Dado que la concentración del fluido folicular se diluye a la mitad tras cargarlo en la cámara, éste se preparó al doble de la concentración deseada. En la cámara que se dejó como control, se añadió el mismo volumen de mHTF-BSA con los espermatozoides. La disposición experimental se plasma en la figura 6.



**Figura 6. Esquema resumen de disposición de los dispositivos para las 3 muestras espermáticas ensayadas:** sin capacitar (*swim-up*) y capacitadas en TALP (*cap-TALP*) y en TALP con agentes elevadores del AMPc (*cap-CK*). En las cámaras “control” no hay fluido folicular (FF), y en las cámaras 2% FF y 10% FF se inyectó el fluido folicular a dichas concentraciones. Fuente: Imagen adaptada de [ibidi.com](https://ibidi.com) (2021)

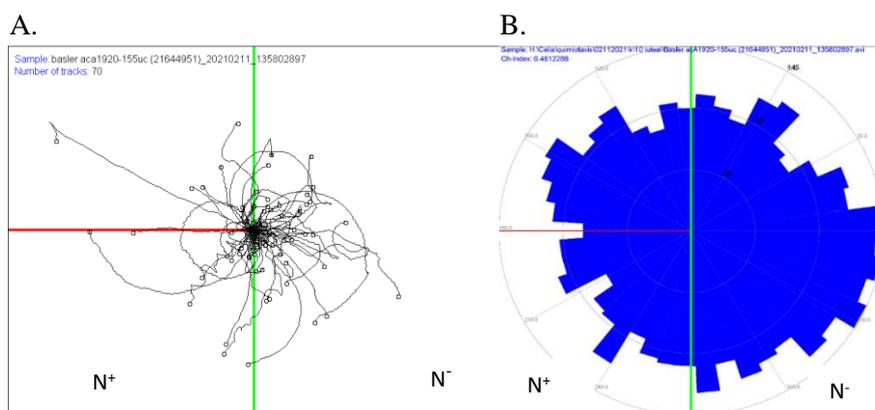
<https://ibidi.com/channel-slides/9--slide-chemotaxis-ibitreat.html>

Se realizaron un total de 5 experimentos (repeticiones) con las tres condiciones experimentales (control, 2%, y 10% FF), para cada tipo de fluido folicular (fase folicular tardía (**FFT**) y fase luteal tardía (**FLT**)) usando espermatozoides sin capacitar (*swim-up*), y capacitados en medio TALP sin (*cap-TALP*) y con un *cocktail* de sustancias elevadoras del AMPc (*cap-CK*).

Los desplazamientos de los espermatozoides se grabaron en el puente central gracias a una cámara de vídeo (acA1920-155uc, Basler, Exton, PA, EE.UU.) acoplada a un microscopio de contraste de fases (Nikon eclipse 50i, Nikon, Tokyo, Japón). Se grabaron cuatro vídeos de 3 segundos (en cuatro campos diferentes) para cada condición experimental (control, 2% y 10% FF). Los vídeos se tomaron a una resolución de 800x600 píxeles por pulgada (ppp) y a 200 fotogramas/segundo (fps).

### 5.7.2. Análisis quimiotáctico mediante el Software Open Casa

Los vídeos obtenidos se analizaron usando el módulo de quimiotaxis del software libre OpenCASA (*Chemotaxis module*), desarrollado por el grupo de investigación en el que se ha realizado el presente trabajo (74). Este módulo detecta las trayectorias de espermatozoides individuales y las representa normalizándolas a un mismo punto de referencia (origen), para poder comparar las trayectorias (Figura 7). Se selecciona una región del plano para delimitar el área de posible influencia ejercida por el gradiente de la hipotética sustancia quimioatrayente, en este caso, de fluido folicular.



**Figura 7. Representación del análisis quimiotáctico proporcionada por el software OpenCASA.** La sección izquierda corresponde a los espermatozoides quimio atraídos ( $N^+$ ). Los espermatozoides no quimioatraídos ( $N^-$ ) en la sección derecha. **A.** En el centro se representan las trayectorias relativas de los espermatozoides. Arriba a la izquierda se indica el número de *tracks* y la muestra analizada (escogida al azar). **B.** Población de espermatozoides quimioatraído con un ángulo de llegada de la sustancia quimiotáctica de  $180^\circ$  (mitad izquierda). Arriba a la izquierda se indica el valor de *Ch index* y la muestra analizada (escogida al azar para la representación de esta imagen).

La expresión para el cálculo del índice Ch que utiliza el *software* es la siguiente:

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

En este caso, como el fluido folicular se colocó en el reservorio de la derecha de cada cámara, se consideraron como quimioatraídos aquellos espermatozoides que presentaron mayoría de ángulos de desplazamiento apuntando hacia la derecha, debido a que por ese lado el fluido folicular ejerce su posible influencia. Sin embargo, debido al sistema de lentes del microscopio, que invierte la imagen, en el software se seleccionó el valor de  $180^\circ$  para el análisis. Una vez que el programa analiza todas las trayectorias de cada video, proporciona el índice quimiotáctico denominado índice Ch (de *Chemotaxis index*), que corresponde al porcentaje de desplazamientos (ángulos) instantáneos apuntando en la dirección del gradiente quimiotáctico, respecto al número total de ángulos de desplazamiento registrados (74). Este valor se expresa en tanto por uno, por lo que su valor varía entre 0 y 1, siendo el valor 1 el que correspondería a un desplazamiento neto por parte de todas las células analizadas hacia la sustancia quimiotáctica. Es decir, cuanto mayor sea el índice, habrá una mayor cantidad de ángulos en dirección al gradiente y por ello mayor quimioatracción.

Además del índice Ch, el módulo de quimiotaxis del *software* OpenCASA también proporciona otra forma de medir la quimiotaxis, que es el índice SL (de *Straight Line index*). Este parámetro da información sobre el porcentaje de espermatozoides cuya trayectoria entra dentro de la zona de influencia del gradiente quimiotáctico ( $180^\circ$ ) en base únicamente a su posición inicial y final sin tener en cuenta el recorrido.

## 5.8. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de los resultados se llevaron a cabo utilizando el *software* GraphPad PRISM® (versión 8.0.1 (244); USA).

Para determinar la existencia de posibles diferencias significativas ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  o  $p < 0,001$ ) en los resultados de motilidad, viabilidad, CTC e índice SL, se llevó a cabo un estudio con distribución Chi cuadrado ( $\chi^2$ ), mientras que el índice Ch se analizó con ANOVA no paramétrica (Test de Kruskal-Wallis). Los resultados se muestran como la media  $\pm$  error estándar de la media (mean  $\pm$  SEM).

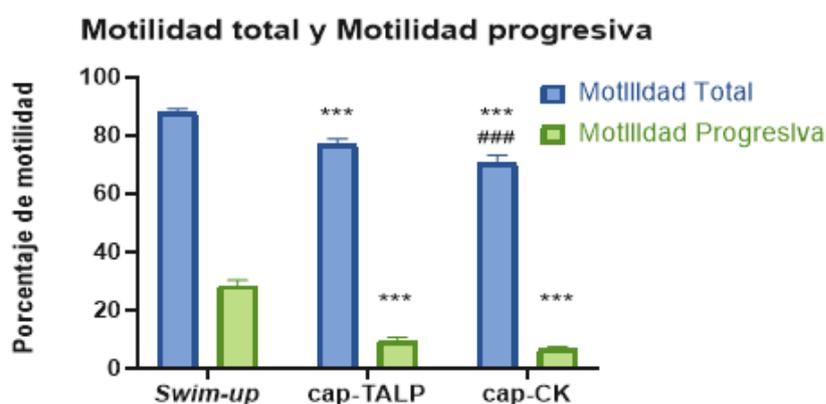
## 6. Resultados y discusión

### 6.1. Evaluación de la calidad de las muestras espermáticas

Previamente a los ensayos de quimiotaxis, se evaluó la calidad de las muestras seminales, con relación a la motilidad y viabilidad. Además, se comprobó el estado de capacitación en las distintas muestras antes (*swim-up*) y tras la inducción de la capacitación *in vitro* en medio TALP sin y con un *cocktail* de sustancias elevadoras del AMPc, con el fin de verificar la eficacia del proceso.

#### 6.1.1. Motilidad

Los valores medios de los porcentajes de motilidad total y progresiva en las muestras seleccionadas mediante *swim-up* fueron  $88,10 \pm 1,20\%$  y  $28,54 \pm 1,86\%$ , respectivamente (Figura 8). Estos valores disminuyeron significativamente ( $p < 0,001$ ) tanto en las muestras capacitadas en medio TALP (cap-TALP) como en medio *cocktail* (cap-CK), con valores de  $79,98 \pm 1,86\%$  y  $70,52 \pm 2,72\%$  de motilidad total y  $9,66 \pm 1,12\%$  y  $6,97 \pm 0,66\%$  de motilidad progresiva en cap-TALP y cap-CK, respectivamente.



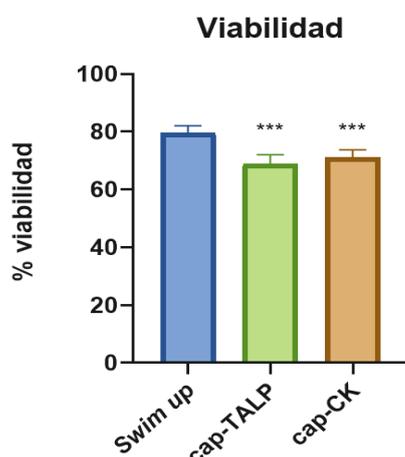
**Figura 8. Motilidad total y progresiva**, evaluadas por el sistema Open-CASA, de muestras de espermatozoides ovinos sin capacitar (*swim-up*) y sometidas a capacitación *in vitro* en medio TALP sin (cap-TALP) y con un *cocktail* de sustancias elevadoras del AMPc (cap-CK). Los resultados se muestran en porcentaje (%) como media  $\pm$  SEM (n=10): \*\*\*, indica diferencias significativas respecto a la muestra *swim-up* y ### respecto a la muestra capacitada en medio TALP ( $p < 0,001$ ).

El descenso en el porcentaje de motilidad total de las muestras capacitadas respecto a la muestra *swim-up* podría deberse a que durante las dos horas de incubación *in vitro* en condiciones capacitantes los espermatozoides van agotando sus reservas energéticas y, por tanto, reduciendo su motilidad (83). El mayor descenso en la motilidad total de las muestras cap-CK respecto a las cap-TALP ( $p < 0,001$ ) podría atribuirse al hecho de que los agentes elevadores del AMPc promueven en mayor medida la capacitación espermática (83).

La disminución en la motilidad progresiva en muestras capacitadas también coincidió con lo esperado (85), puesto que la capacitación está relacionada con la hiperactivación espermática, en la que hay un cambio de patrón de movimiento en los espermatozoides, pasando de trayectorias rectilíneas a curvilíneas y describiendo un movimiento “vigoroso” con una mayor amplitud del batido flagelar en comparación con los espermatozoides no capacitados (86).

### 6.1.2. Viabilidad (integridad de la membrana)

Respecto a la viabilidad (integridad de la membrana plasmática), se observó un descenso después de la capacitación *in vitro*. El valor medio de espermatozoides con la membrana intacta en las muestras sin capacitar ( $79,64 \pm 2,47\%$ ) se redujo significativamente ( $p < 0,001$ ) hasta  $68,8 \pm 3,22\%$  y  $71,23 \pm 2,53\%$  en las muestras cap-TALP y cap-CK, respectivamente. No obstante, entre las muestras capacitadas no se produjo ningún cambio notable, como se observa en la figura 9.



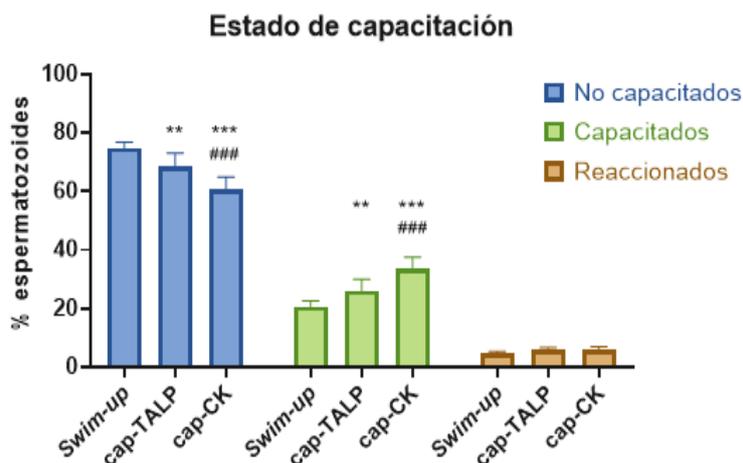
**Figura 9. Viabilidad (integridad de la membrana evaluada por tinción con CFDA/PI y visualizada por citometría de flujo)** de muestras de espermatozoides ovinos sin capacitar (*swim-up*) y sometidas a capacitación *in vitro* en medio TALP sin (cap-TALP) y con un *cocktail* de sustancias elevadoras del AMPc (cap-CK). Los resultados se expresan en porcentaje (%), como media  $\pm$  SEM (n=10); \*\*\* indica diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) frente a la muestra *swim-up*.

En este caso, la disminución del porcentaje de espermatozoides viables (con membrana íntegra) también sería atribuible al tiempo de incubación en condiciones capacitantes y a los cambios en la membrana debidos a la desestabilización provocada por el propio proceso de capacitación (87). No obstante, los porcentajes de viabilidad tras el proceso fueron altos, y por tanto las muestras se consideraron aptas para llevar a cabo los estudios de quimiotaxis.

### 6.1.3. Estado de capacitación (CTC)

Los resultados obtenidos de la evaluación del estado de capacitación mediante tinción con clorotetraciclina (CTC), revelaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides no capacitados en los tres tipos de muestras, como se observa en la figura 10. Los valores medios de espermatozoides no capacitados disminuyeron significativamente ( $p < 0,001$ ), pasando de una media de  $74,70 \pm 2,11\%$  en las muestras *swim-up* a  $68,40 \pm 4,66\%$  y  $60,44 \pm 4,49\%$  en las muestras capacitadas *in vitro*, cap-TALP y cap-CK, respectivamente. De manera concomitante, el porcentaje de espermatozoides capacitados aumentó significativamente desde  $20,60 \pm 1,97\%$  en las muestras *swim-up* hasta  $25,90 \pm 4,06\%$  en cap-TALP ( $p < 0,01$ ) y  $33,56 \pm 3,98\%$  en cap-CK ( $p < 0,001$ ). Asimismo, se observaron diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre ambas muestras capacitadas, con un mayor porcentaje de espermatozoides capacitados en las muestras incubadas en presencia de compuestos elevadores del AMPc (cap-CK).

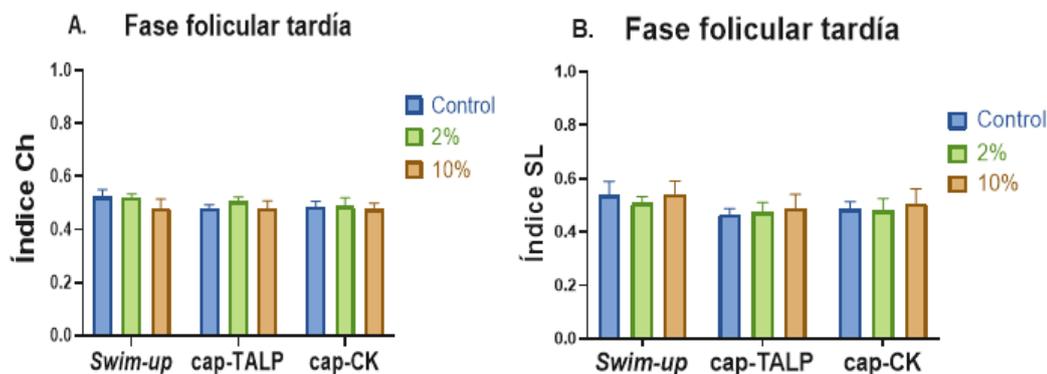
En cuanto a los espermatozoides que ya habían sufrido la reacción acrosómica (“reaccionados”), no se observaron cambios significativos entre muestras ( $4,70 \pm 0,70\%$ ,  $5,70 \pm 0,98\%$  y  $5,89 \pm 1,17\%$  en muestras *swim-up*, cap-TALP y cap-CK, respectivamente).



**Figura 10. Estado de capacitación (evaluado por tinción con CTC y visualización al microscopio de fluorescencia)** de muestras de espermatozoides ovinos sin capacitar (*swim-up*) y sometidas a capacitación *in vitro* en medio TALP sin (*cap-TALP*) y con un *cocktail* de sustancias elevadoras del AMPc (*cap-CK*). Los resultados se expresan en porcentaje (%) como media  $\pm$  SEM (n=10). \*\*\*, \*\* indican diferencias significativas ( $p < 0,001$  y  $p < 0,01$  respectivamente), respecto a la muestra *swim-up*, y ### con respecto a la muestra *cap-TALP* ( $p < 0,001$ ).

## 6.2. Estudio del posible efecto quimioatrayente del fluido folicular sobre los espermatozoides ovinos

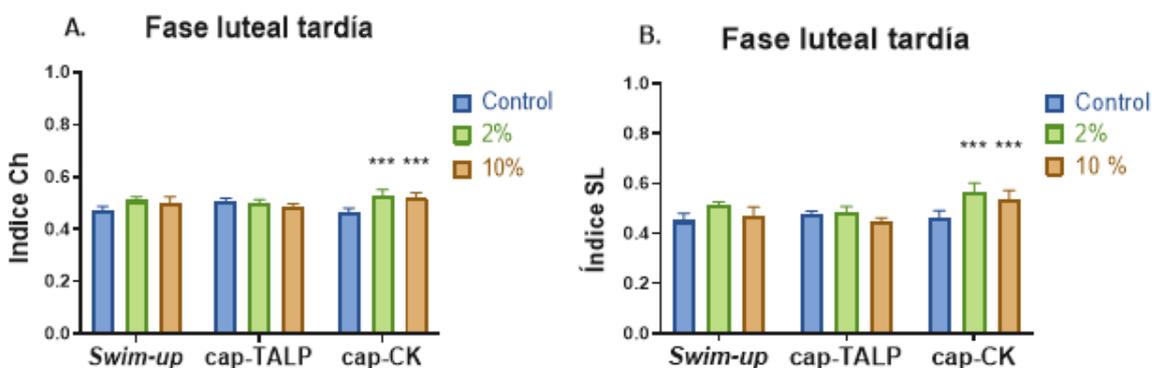
En el presente trabajo se investigó el efecto del fluido folicular de oveja obtenido en fase folicular tardía (FFT) y fase luteal tardía (FLT) sobre la direccionalidad espermática mediante el análisis de los dos índices quimiotácticos descritos previamente (Ch y SL). Cuando se ensayó el fluido de fase folicular tardía (FFT) a distintas concentraciones no se evidenció ningún cambio significativo ni en el valor del índice Ch (Figura 11.A) ni en el SL (Figura 11.B) en ninguna de las muestras espermáticas. Esto significaría que el FFT no tiene capacidad quimioatrayente ni para muestras capacitadas ni sin capacitar a ninguna de las dos concentraciones ensayadas.



**Figura 11. Respuesta quimiotáctica de los espermatozoides ovinos frente al fluido folicular de oveja obtenido en fase folicular tardía (FFT): valores de los índices Ch (A) y SL (B)** de muestras de espermatozoides ovinos sin capacitar (*swim-up*) y sometidas a capacitación *in vitro* en medio TALP sin (*cap-TALP*) y con un *cocktail* de sustancias elevadoras del AMPc (*cap-CK*) en ausencia (control) o presencia de diferentes concentraciones de FFT (2% y 10%) en las cámaras de los dispositivos *IBIDI®  $\mu$ -Slide Chemotaxis*. Los resultados se expresan en tanto por uno, como valor medio  $\pm$  SEM (n=5).

En el caso del fluido folicular obtenido en fase luteal tardía (FLT), cuando se analizaron los índices Ch y SL, tampoco se observó ningún efecto quimioatrayente ni para espermatozoides sin capacitar (*swim-up*) ni capacitados en medio TALP (*cap-TALP*) a ninguna de las concentraciones de fluido ensayadas (Figura 12.A y 12.B). Sin embargo, los espermatozoides capacitados en medio *cocktail* (*cap-CK*) sí mostraron respuesta quimiotáctica frente al FLT, ya que tanto el índice Ch como el SL fueron significativamente mayores ( $p < 0,001$ ) en presencia del fluido al 2% y 10%

en comparación con la muestra control (sin FLT en el dispositivo *IBIDI® μ-Slide Chemotaxis*) (Figura 12.A y 12.B).



**Figura 12. Respuesta quimiotáctica de los espermatozoides ovinos frente al fluido folicular de oveja obtenido en fase luteal tardía (FLT): valores de los índices Ch (A) y SL (B) de espermatozoides sin capacitar (*swim-up*) y sometidos a capacitación *in vitro* en medio TALP sin (cap-TALP) y con un *cocktail* de sustancias capacitantes (cap-CK) en ausencia (control) o presencia de diferentes concentraciones de FLT (2% y 10%) en las cámaras de los dispositivos *IBIDI® μ-Slide Chemotaxis*. Los resultados se expresan en tanto por uno, como valor medio  $\pm$  SEM. (n=5). \*\*\* indica diferencias significativas ( $p < 0,001$ ), respecto al control (0% FLT)**

Este trabajo evidencia que los espermatozoides no son quimioatraídos hacia el fluido folicular obtenido en fase folicular tardía (FFT), pero sí en fase luteal temprana (FLT)

El efecto del fluido folicular sobre la orientación espermática fue descrito por primera vez en humanos (36, 37). Posteriormente se demostró también en otras especies, como en conejo (38), ratón (39). En algunos de estos estudios, se demostró que únicamente los espermatozoides capacitados son capaces de orientarse hacia una sustancia quimioatrayente. Los resultados del presente trabajo también concuerdan con lo publicado, ya que sólo las muestras cap-CK, que eran las que contenían un mayor porcentaje de espermatozoides capacitados en comparación con las otras dos, mostraron una respuesta quimiotáctica frente al FLT.

El hecho de que el fluido folicular obtenido en fase luteal tardía (FLT) diese lugar a una respuesta quimiotáctica y el obtenido en fase folicular tardía (FFT) no, podría atribuirse a que, dado que la actividad metabólica cambia durante los distintos estadios de desarrollo folicular, la composición bioquímica de este fluido también es variable a lo largo del ciclo estral (23). En concreto, se sabe que existen diferencias en cuanto a los niveles de ciertas hormonas, como los estrógenos y la progesterona. Así, en la fase folicular la hormona predominante es el 17- $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), secretado por los folículos en crecimiento, mientras que en la fase luteal la hormona dominante es la progesterona ( $P_4$ ), secretada por el cuerpo lúteo (31). Ya que es el fluido folicular de fase luteal tardía el que presenta efecto quimioatrayente, la progesterona podría ser uno de los posibles compuestos con actividad quimiotáctica. Esta hormona, además de estar implicada en la capacitación, hiperactivación y reacción acrosómica (88, 89), ya se ha postulado como agente quimioatrayente para espermatozoides de algunas especies como conejo y humano (38). Aun así, debido a que el fluido ensayado es un fluido heterogéneo y variable, sería necesario un futuro estudio de su composición específica y un análisis del efecto quimioatrayente de determinados componentes por separado. A este respecto, nuestro grupo de investigación ya ha realizado ensayos de quimiotaxis sólo con determinadas hormonas presentes en el tracto reproductor femenino, entre ellas la progesterona y el estradiol (datos no publicados).

Los espermatozoides de mamíferos poseen receptores de membrana tanto para la progesterona (PR) como para el estradiol ( $ER\alpha$  y  $ER\beta$ ). En el espermatozoide ovino se han descrito en la región ecuatorial y en la pieza intermedia (45) y la unión de esas hormonas a sus respectivos receptores

da lugar a efectos no genómicos sobre la funcionalidad espermática (motilidad progresiva, reacción acrosómica y capacitación) (46). Para averiguar si el efecto quimotáctico tiene lugar también vía receptores de membrana, habría que realizar estos ensayos de quimotaxis de nuevo con agonistas y antagonistas de estos receptores de hormonas. Es interesante mencionar que, a diferencia del receptor de progesterona, el de estradiol (ER $\beta$ ), disminuye su presencia en el espermatozoide ovino tras la capacitación (45, 46), lo que apuntaría a que el estradiol no tuviese una acción quimotáctica sobre espermatozoides capacitados, al menos a través de este receptor, y por tanto, el fluido de la fase folicular, en el que esta hormona es la predominante, no tendría efecto quimioatrayente, como se ha demostrado en el presente trabajo.

En cuanto a la concentración efectiva de fluido folicular, en este trabajo, tanto el 2% como el 10% de FLT aumentaron los índices quimiotácticos en espermatozoides capacitados en medio *cocktail* (cap-CK). Sin embargo, otros trabajos describen que el efecto quimiotáctico depende de la concentración de quimioatrayente (47). Puede ser que, en nuestro caso, si la respuesta de quimiotaxis se corresponde con una representación de una curva de campana, estemos en el rango de concentraciones anteriores y posteriores a la máxima efectiva (37). Si así fuese, una elevada concentración de quimioatrayente podría saturar los receptores específicos en el espermatozoide y, quizás, disminuir la respuesta quimiotáctica (41). También podría ser que con una concentración del 2% o inferior se alcanzase la saturación y no se viesen diferencias para concentraciones superiores. Para comprobarlo, sería necesario realizar estos ensayos con un rango más amplio de concentraciones de FLT.

## 7. Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos, las conclusiones que pueden extraerse son las siguientes:

1. El fluido folicular de oveja obtenido en la fase folicular tardía no tiene efecto quimioatrayente sobre los espermatozoides ovinos
2. El fluido folicular de oveja obtenido en la fase luteal tardía tiene efecto quimioatrayente sobre los espermatozoides ovinos a concentraciones del 2% y el 10%.
3. Solo los espermatozoides ovinos capacitados *in vitro* en presencia de agentes elevadores del AMPc son capaces de moverse en la dirección del gradiente creado por el fluido folicular obtenido en la fase luteal tardía del ciclo estral de la oveja.

## 8. Conclusions

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

1. Sheep follicular fluid obtained in the late follicular phase has no chemoattractant effect on ram spermatozoa.
2. Sheep follicular fluid obtained from the late luteal phase, has a chemoattractant effect on ram spermatozoa at concentrations of 2% and 10%
3. Only ram spermatozoa capacitated *in vitro* in presence of cAMP elevating agents are able of moving in the direction of the gradient created by the follicular fluid obtained in the late luteal phase of estrous cycle of the sheep. Sheep follicular fluid obtained in the late follicular phase has no chemoattractant effect on ram spermatozoa.

## 9. Bibliografía

1. Griswold MD. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiological Reviews*. 2016;96(1):1-17.
2. Yanagimachi R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*. 1994;2(4):371-2.
3. Rickard JP, Pool KR, Druart X, de Graaf SP. The fate of spermatozoa in the female reproductive tract: A comparative review. *Theriogenology*. 2019;137:104-12.
4. Austin CR. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res B*. 1951;4(4):581-96.
5. Austin CR. The 'Capacitation' of the Mammalian Sperm. *Nature*. 1952;170(4321):326-.
6. Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*. 1951;168(4277):697-8.
7. Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C, Forti G. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Front Biosci*. 1996;1:d189-205.
8. Visconti PE, Muschietti JP, Flawia MM, Tezon JG. Bicarbonate dependence of cAMP accumulation induced by phorbol esters in hamster spermatozoa. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1054(2):231-6.
9. Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol*. 2002;53(1-2):133-50.
10. Breitbart H. Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2003;49(3):321-7.
11. Naresh S, Atreja SK. The protein tyrosine phosphorylation during in vitro capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Cryobiology*. 2015;70(3):211-6.
12. Chang H, Suarez SS. Rethinking the relationship between hyperactivation and chemotaxis in mammalian sperm. *Biol Reprod*. 2010;83(4):507-13.
13. Suarez SS, Ho HC. Hyperactivation of mammalian sperm. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2003;49(3):351-6.
14. Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, et al. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*. 1995;121(4):1139-50.
15. Sun X-H, Zhu Y-Y, Wang L, Liu H-L, Ling Y, Li Z-L, et al. The Catsper channel and its roles in male fertility: a systematic review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2017;15(1).
16. Mujica A, Neri-Bazan L, Tash JS, Uribe S. Mechanism for procaine-mediated hyperactivated motility in guinea pig spermatozoa. *Mol Reprod Dev*. 1994;38(3):285-92.
17. Zaneveld LJ, De Jonge CJ, Anderson RA, Mack SR. Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod*. 1991;6(9):1265-74.
18. Arenas-Ríos E, Angel, Ruiz C, García D, Pablo P, Rubio Z, et al. Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide. *contactos*. 2010;78:5-11.
19. Gupta SK. The Human Egg's Zona Pellucida. *Curr Top Dev Biol*. 2018;130:379-411.
20. Evans JP. Preventing polyspermy in mammalian eggs-Contributions of the membrane block and other mechanisms. *Molecular Reproduction and Development*. 2020;87(3):341-9.

21. Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*. 2000;1469(3):197-235.
22. Basuino L, Silveira CF, Jr. Human follicular fluid and effects on reproduction. *JBRA Assist Reprod*. 2016;20(1):38-40.
23. Leroy JL, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PE, et al. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Anim Reprod Sci*. 2004;80(3-4):201-11.
24. de los Santos MJ, García-Láez V, Beltrán-Torregrosa D, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, et al. Hormonal and molecular characterization of follicular fluid, cumulus cells and oocytes from pre-ovulatory follicles in stimulated and unstimulated cycles. *Hum Reprod*. 2012;27(6):1596-605.
25. Ganguly A, Ganguly I, Meur SK. Multiple molecular forms of inhibin in buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian follicular fluid. *Res Vet Sci*. 2010;89(1):14-9.
26. Minguini IP, Luquetti CM, Baracat MCP, Maganhin CC, Nunes CO, Simoes RS, et al. Melatonin effects on ovarian follicular cells: a systematic review. *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2019;65(8):1122-7.
27. Brzezinski A, Seibel MM, Lynch HJ, Deng MH, Wurtman RJ. Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987;64(4):865-7.
28. Pacheco J, Coila Y, Coila Añasco P. Composition of the follicular fluid of alpaca (*Vicugna pacos*) in different states of development. *Archivos de Zootecnia*. 2010;59:451-4.
29. Olivera M, Ruiz T, Tarazona A, Giraldo C. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2006;19:426-36.
30. Kaupp UB, Kashikar ND, Weyand I. Mechanisms of sperm chemotaxis. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:93-117.
31. Senger PL. Pathways to pregnancy and parturition: Current Conceptions, Inc., 1615 NE Eastgate Blvd.; 1997.
32. Bahat A, Eisenbach M. Sperm thermotaxis. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;252(1-2):115-9.
33. Miki K, Clapham David E. Rheotaxis Guides Mammalian Sperm. *Current Biology*. 2013;23(6):443-52.
34. Armon L, Eisenbach M. Behavioral Mechanism during Human Sperm Chemotaxis: Involvement of Hyperactivation. *PLOS ONE*. 2011;6(12):e28359.
35. Perez-Cerezales S, Boryshpolets S, Eisenbach M. Behavioral mechanisms of mammalian sperm guidance. *Asian journal of andrology*. 2015;17(4):628-32.
36. Cohen-Dayag A, Tur-Kaspa I, Dor J, Mashiach S, Eisenbach M. Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(24):11039-43.
37. Ralt D, Manor M, Cohen-Dayag A, Tur-Kaspa I, Ben-Shlomo I, Makler A, et al. Chemotaxis and chemokinesis of human spermatozoa to follicular factors. *Biol Reprod*. 1994;50(4):774-85.
38. Fabro G, Rovasio RA, Civalero S, Frenkel A, Caplan SR, Eisenbach M, et al. Chemotaxis of capacitated rabbit spermatozoa to follicular fluid revealed by a novel directionality-based assay. *Biol Reprod*. 2002;67(5):1565-71.

39. Oliveira RG, Tomasi L, Rovasio RA, Giojalas LC. Increased velocity and induction of chemotactic response in mouse spermatozoa by follicular and oviductal fluids. *J Reprod Fertil.* 1999;115(1):23-7.
40. Gil PI, Guidobaldi HA, Teves ME, Unates DR, Sanchez R, Giojalas LC. Chemotactic response of frozen-thawed bovine spermatozoa towards follicular fluid. *Anim Reprod Sci.* 2008;108(1-2):236-46.
41. Vieira LA, Diana A, Soriano-Úbeda C, Matás C. Selection of Boar Sperm by Reproductive Biofluids as Chemoattractants. *Animals.* 2021;11(1):53.
42. Eisenbach M. Sperm chemotaxis. *Rev Reprod.* 1999;4(1):56-66.
43. Wang Y, Storeng R, Dale PO, Abyholm T, Tanbo T. Effects of follicular fluid and steroid hormones on chemotaxis and motility of human spermatozoa in vitro. *Gynecol Endocrinol.* 2001;15(4):286-92.
44. Bishop CV, Stormshak F. Non-genomic actions of progesterone and estrogens in regulating reproductive events in domestic animals. *The Veterinary Journal.* 2008;176(3):270-80.
45. Gimeno-Martos S, Gonzalez-Arto M, Casao A, Gallego M, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T, et al. Steroid hormone receptors and direct effects of steroid hormones on ram spermatozoa. *Reproduction.* 2017;154(4):469-81.
46. Gimeno-Martos S, Santorroman-Nuez M, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T, Perez-Pe R, Casao A. Involvement of progesterone and estrogen receptors in the ram sperm acrosome reaction. *Domest Anim Endocrinol.* 2021;74:106527.
47. Teves ME, Barbano F, Guidobaldi HA, Sanchez R, Miska W, Giojalas LC. Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertil Steril.* 2006;86(3):745-9.
48. Claustrat B, Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie.* 2015;61(2-3):77-84.
49. Revel FG, Masson-Pévet M, Pévet P, Mikkelsen JD, Simonneaux V. Melatonin Controls Seasonal Breeding by a Network of Hypothalamic Targets. *Neuroendocrinology.* 2009;90(1):1-14.
50. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2014;71(16):2997-3025.
51. Bubenik GA. REVIEW: Gastrointestinal Melatonin: Localization, Function, and Clinical Relevance. *Digestive Diseases and Sciences.* 2002;47(10):2336-48.
52. Gonzalez-Arto M, Hamilton TRDS, Gallego M, Gaspar-Torrubia E, Aguilar D, Serrano-Blesa E, et al. Evidence of melatonin synthesis in the ram reproductive tract. *Andrology.* 2016;4(1):163-71.
53. Casao A, Cebrián I, Asumpção ME, Pérez-Pé R, Abecia JA, Forcada F, et al. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E.* 2010;8:59-.
54. Casao A, Mendoza N, Pérez-Pé R, Grasa P, Abecia JA, Forcada F, et al. Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. *J Pineal Res.* 2010;48(1):39-46.
55. Miguel-Jimenez S, Pina-Beltran B, Gimeno-Martos S, Carvajal-Serna M, Casao A, Perez-Pe R. NADPH Oxidase 5 and Melatonin: Involvement in Ram Sperm Capacitation. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:655794.

56. Casao A, Gallego M, Abecia JA, Forcada F, Pérez-Pé R, Muiño-Blanco T, et al. Identification and immunolocalisation of melatonin MT1 and MT2 receptors in Rasa Aragonesa ram spermatozoa. *Reproduction, fertility, and development*. 2012;24:953-61.
57. Gonzalez-Arto M, Luna C, Pérez-Pé R, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez J, Casao A. New evidence of melatonin receptor contribution to ram sperm functionality. *Reproduction, fertility, and development*. 2014;28.
58. Peña C, Rincon J, Pedreanez A, Viera N, Mosquera J. Chemotactic effect of melatonin on leukocytes. *J Pineal Res*. 2007;43(3):263-9.
59. Feldmesser E, Olender T, Khen M, Yanai I, Ophir R, Lancet D. Widespread ectopic expression of olfactory receptor genes. *BMC Genomics*. 2006;7(1):121.
60. Spehr M, Gisselmann G, Poplawski A, Riffell JA, Wetzel CH, Zimmer RK, et al. Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science*. 2003;299(5615):2054-8.
61. Ali MA, Wang Y, Qin Z, Yuan X, Zhang Y, Zeng C. Odorant and Taste Receptors in Sperm Chemotaxis and Cryopreservation: Roles and Implications in Sperm Capacitation, Motility and Fertility. *Genes (Basel)*. 2021;12(4).
62. Falasca M, Raimondi C, Maffucci T. Boyden chamber. *Methods Mol Biol*. 2011;769:87-95.
63. Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med*. 1962;115(3):453-66.
64. Zigmond SH. Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *J Cell Biol*. 1977;75(2 Pt 1):606-16.
65. Zicha D, Dunn GA, Brown AF. A new direct-viewing chemotaxis chamber. *J Cell Sci*. 1991;99 ( Pt 4):769-75.
66. Nadal P, Peinado, J., Gimeno, S., Casao, A., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T. and Pérez-Pé, R The inclusión of progesterone in the dextran/swim-up procedure increases the recovery of ram capacitated sperm rate. 2016.
67. T.Muiño-Blanco JP, P.Nadal, S.Gimeno, A.Casao, J.Cebrián-Pérez and R.Pérez-Pé An implemented dextran/swim-up technique with estradiol for the separation of a sperm subpopulation enriched in non-capacitated with no phosphatidylserine exposure cells. 2016.
68. Zengel P, Nguyen-Hoang A, Schildhammer C, Zantl R, Kahl V, Horn E.  $\mu$ -Slide Chemotaxis: A new chamber for long-term chemotaxis studies. *BMC Cell Biology*. 2011;12(1):21.
69. Armon L, Caplan SR, Eisenbach M, Friedrich BM. Testing human sperm chemotaxis: how to detect biased motion in population assays. *PloS one*. 2012;7(3):e32909-e.
70. Ko Y-J, Maeng J-H, Hwang SY, Ahn Y. Design, fabrication, and testing of a microfluidic device for thermotaxis and chemotaxis assays of sperm. *SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences Innovation*. 2018;23(6):507-15.
71. Miller RL. Demonstration of sperm chemotaxis in echinodermata: Asteroidea, Holothuroidea, Ophiuroidea. *Journal of Experimental Zoology*. 1985;234(3):383-414.
72. Boyers SP, Davis RO, Katz DF. Automated semen analysis: Year Book Medical Publishers; 1989.
73. Amann RP, Waberski D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*. 2014;81(1):5-17.e3.

74. Alquezar-Baeta C, Gimeno-Martos S, Miguel-Jimenez S, Santolaria P, Yaniz J, Palacin I, et al. OpenCASA: A new open-source and scalable tool for sperm quality analysis. *PLoS Comput Biol.* 2019;15(1):e1006691.
75. Eisenbach M. Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation. *Dev Genet.* 1999;25(2):87-94.
76. Ollero M, Muino-Blanco T, Lopez-Perez MJ, Cebrian-Perez JA. Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. *Int J Androl.* 1996;19(5):287-92.
77. Alvarez JG, Lasso JL, Blasco L, Nunez RC, Heyner S, Caballero PP, et al. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. *Hum Reprod.* 1993;8(7):1087-92.
78. García-López N, Ollero M, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. A dextran swim-up procedure for separation of highly motile and viable ram spermatozoa from seminal plasma. *Theriogenology.* 1996;46(1):141-51.
79. Colas C, James P, Howes L, Jones R, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T. Cyclic-AMP initiates protein tyrosine phosphorylation independent of cholesterol efflux during ram sperm capacitation. *Reprod Fertil Dev.* 2008;20(6):649-58.
80. Harrison RA, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1990;88(1):343-52.
81. Abecia A, Forcada F. Manejo reproductivo en ganado ovino. Servet, editor: Servet 2011.
82. Ward CR, Storey BT. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev Biol.* 1984;104(2):287-96.
83. Grasa P, Cebrián-Pérez J, Muiño-Blanco T. Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation. *Reproduction (Cambridge, England).* 2006;132:721-32.
84. Teijeiro JM. Determinación del rol biológico de SBG (Sperm Binding Glycoprotein) aislada de oviducto porcino sobre espermatozoides homólogos. 2010.
85. Luna C, Yeste M, Rivera Del Alamo MM, Domingo J, Casao A, Rodriguez-Gil JE, et al. Effect of seminal plasma proteins on the motile sperm subpopulations in ram ejaculates. *Reprod Fertil Dev.* 2017;29(2):394-405.
86. Kay VJ, Robertson L. Hyperactivated motility of human spermatozoa: a review of physiological function and application in assisted reproduction. *Hum Reprod Update.* 1998;4(6):776-86.
87. Gadella BM. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim Reprod Sci.* 2008;107(3-4):229-36.
88. Baldi E, Luconi M, Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Forti G. Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;308(1-2):39-46.
89. Sagare-Patil V, Galvankar M, Satiya M, Bhandari B, Gupta SK, Modi D. Differential concentration and time dependent effects of progesterone on kinase activity, hyperactivation and acrosome reaction in human spermatozoa. *Int J Androl.* 2012;35(5):633-44.