



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Efecto de la estacionalidad reproductiva sobre los procesos de selección espermática y capacitación *in vitro* en espermatozoides de morueco

Effect of the reproductive seasonality on ram sperm selection and *in vitro* capacitation

Autora:

María Hernández Pérez

Directoras:

Adriana Casao Gascón

Rosaura Pérez Pe

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular.
Grupo de investigación: Biología, Fisiología y Tecnologías de la Reproducción (BIOFITER).

Junio de 2024

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1 TRÁNSITO DEL ESPERMATOZOIDE POR EL TRACTO REPRODUCTOR FEMENINO.....	2
2.2.1 Capacitación <i>in vivo</i>	2
2.2.2 Reacción acrosómica	3
2.2 TÉCNICAS DE BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA EN EL ESPERMATOZOIDE ...	3
2.2.1 Proceso de selección espermática: <i>swim-up</i>	3
2.2.2 Capacitación <i>in vitro</i>	4
2.2.3 Aglutinación espermática	4
2.3 ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA DE LA ESPECIE OVINA	5
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	6
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
4.1 PROCESADO DE LA MUESTRA ESPERMÁTICA	7
4.1.1 Obtención de las muestras seminales.....	7
4.1.2 Método <i>swim-up</i> /dextrano	7
4.1.3 Evaluación de la concentración de espermatozoides.....	8
4.1.4 Capacitación <i>in vitro</i>	8
4.2 EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS.....	8
4.2.1 Análisis de la motilidad espermática	9
4.2.2 Estudio de la viabilidad celular	9
4.2.3 Análisis del estrés oxidativo (niveles de ROS)	9
4.2.4 Evaluación del estado apoptótico	10
4.2.5 Evaluación del estado de capacitación.....	10
4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	12
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
5.1 EFECTO DE LA ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA SOBRE LA SELECCIÓN ESPERMÁTICA	13
5.2 EFECTO DE LA ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA SOBRE LA CAPACITACIÓN <i>IN VITRO</i> DE ESPERMATOZOIDES OVINOS.....	16
5.3 EFECTO DEL COMPUESTO ANTI-AGLUTINANTE D-PENICILAMINA SOBRE LA CAPACITACIÓN <i>IN VITRO</i> DE ESPERMATOZOIDES OVINOS DURANTE LA ÉPOCA NO REPRODUCTIVA	18
6. CONCLUSIONES.....	21
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

1. RESUMEN

La especie ovina sigue un patrón de reproducción estacional, con una estación reproductiva en otoño e invierno y una estación no reproductiva en primavera y verano. Durante la época no reproductiva, la mayoría de los estudios señalan que la calidad seminal del morueco es peor que en la época reproductiva. Sin embargo, no existen estudios sobre cómo afecta la estacionalidad a determinadas biotecnologías reproductivas realizadas en espermatozoides de esta especie. Por ello, este trabajo se centró en analizar el efecto de la estacionalidad sobre los resultados de los procesos de selección espermática mediante el método *swim-up*/dextrano, y tras la capacitación espermática *in vitro* de la especie ovina. Se evaluó la motilidad, viabilidad, estado apoptótico, daño oxidativo y estado de capacitación en muestras de semen fresco, seleccionadas por *swim-up* y capacitadas *in vitro* en medio TALP y medio *Cocktail*, que dispara eficientemente la capacitación en los espermatozoides ovinos.

Los resultados obtenidos revelaron que la muestra espermática seleccionada tras el proceso *swim-up*/dextrano fue de mayor calidad en la época no reproductiva que en la época reproductiva, con una mayor viabilidad y un menor porcentaje de espermatozoides capacitados. En cuanto a la capacitación *in vitro*, la estacionalidad reproductiva apenas afectó a los resultados.

Además, durante la época no reproductiva se observó el fenómeno de aglutinación espermática, por lo que también se estudió el efecto del compuesto anti-aglutinante D-Penicilamina durante la capacitación *in vitro*. Con el uso de este compuesto se observó una mejoría significativa en la viabilidad analizada de las muestras capacitadas en ambos medios, sin llegar a afectar al estado de capacitación.

En conclusión, los resultados de este trabajo indican la existencia de una distinta respuesta de los espermatozoides obtenidos en distintas épocas del año a los procesos de selección espermática y, en menor medida, a la capacitación *in vitro*.

ABSTRACT

The ovine species follows a seasonal reproductive pattern, with a breeding season in autumn and winter and a non-breeding season in spring and summer. During the non-breeding season, ram semen quality is worse than during the breeding season. However, there are no studies on how seasonality affects certain reproductive biotechnologies carried out on the spermatozoa of this species. Therefore, this work focused on analysing the effect of seasonality on sperm quality after selection processes by the dextran/swim-up method and after *in vitro* capacitation. Motility, viability, apoptotic status, oxidative damage and capacitation status were evaluated in fresh, swim-up selected and *in vitro* capacitated semen samples in TALP medium and *Cocktail* medium (which increase capacitation in ovine spermatozoa).

The results revealed that dextran/swim-up selected samples was of higher quality in the non-breeding season than in the breeding season, with higher viability and a lower percentage of capacitated spermatozoa. As for *in vitro* capacitation, reproductive seasonality had hardly effect on the results.

In addition, sperm agglutination was observed during the non-breeding season. Thus, the effect of the anti-agglutinating compound D-Penicillamine was also studied during *in vitro* capacitation. With this compound, a significant improvement was observed in the viability of the samples capacitated in both media, without affecting their capacitation state.

In conclusion, the results of this work indicate the existence of a seasonal effect on the spermatozoa obtained at different times of the year to the sperm selection processes and, to a lesser extent, to *in vitro* capacitation.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 TRÁNSITO DEL ESPERMATOZOIDE POR EL TRACTO REPRODUCTOR FEMENINO

Tras el apareamiento entre la hembra y el macho, tan sólo una pequeña proporción de los espermatozoides llega al oviducto, concretamente a la ampolla, que es el sitio de fecundación del espermatozoide con el ovocito. Esto se debe a una serie de procesos que favorecen la selección *in vivo* de los espermatozoides de mayor calidad, la cual se lleva a cabo gracias a las contracciones uterinas (1) que consiguen la eliminación de espermatozoides muertos o anormales (2), a una respuesta inmune que produce la infiltración de neutrófilos al interior del tracto reproductor femenino (3) y al transporte retrógrado hacia la vagina de aquellos espermatozoides que no posean un movimiento vigoroso (4).

Además, los espermatozoides de la especie ovina, al igual que los del resto de los mamíferos, no tienen capacidad de fecundar al ovocito de la hembra tras la eyaculación, sino que deben experimentar una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos durante su tránsito a través del tracto reproductor femenino, conocidos como capacitación espermática, consiguiendo así su capacidad fecundante (5).

2.2.1 Capacitación *in vivo*

Durante el avance del espermatozoide por el tracto reproductor femenino se producen modificaciones intracelulares de los niveles de calcio y otros iones, fosforilación de proteínas y remodelación de fosfolípidos de la membrana plasmática del espermatozoide (6).

En cuanto a la concentración de calcio intracelular, esta se ve aumentada durante la capacitación en gran cantidad de especies, incluida la ovina. Los niveles de este ion están controlados por la bomba de extrusión Ca^{2+} -ATPasa y los sistemas de entrada $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ y $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ que se encuentran en la membrana plasmática, permitiendo la introducción de iones calcio desde el espacio extracelular, y posiblemente también la liberación desde los almacenes de calcio intracelular. Así, durante el tránsito por el tracto reproductor femenino, los cambios conformacionales que sufre el espermatozoide estimulan la introducción de calcio desde el exterior y la salida de sodio (6).

La distribución y composición de lípidos y fosfolípidos de la membrana plasmática también varía durante la capacitación, haciendo que la fluidez de la membrana aumente debido a la translocación de fosfolípidos como la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina (7). Así, se produce una disminución de la relación colesterol:fosfolípidos al eliminarse el colesterol de la membrana, de lo cual son responsables la albúmina sérica bovina (BSA) y las lipoproteínas HDL (6,8).

Del mismo modo, debido a la actividad de proteínas quinasas, gran cantidad de proteínas se fosforilan en residuos de tirosina durante la capacitación. Entre ellas, algunas proteínas fosforiladas de alto peso molecular se han relacionado en ciertas especies con eventos específicos de la capacitación, como las de 52 y 75 kDa, y con procesos fundamentales para la posterior fecundación, como la de 95 kDa, que es responsable de la interacción con proteínas de la zona pelúcida del ovocito (9,10). Esta fosforilación de proteínas es dependiente de la generación de adenosín monofosfato cíclico (cAMP), que activa la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) y esta, a su vez, da lugar a la fosforilación y activación de muchas protein tirosin quinasas (PTK). El ion calcio y bicarbonato también están implicados en el aumento de los niveles de cAMP gracias a la activación de la adenilato ciclasa soluble (sAC) (9). Además, la fosforilación en tirosinas de las proteínas espermáticas depende de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), que aumentan también durante la capacitación (6) (figura 1).

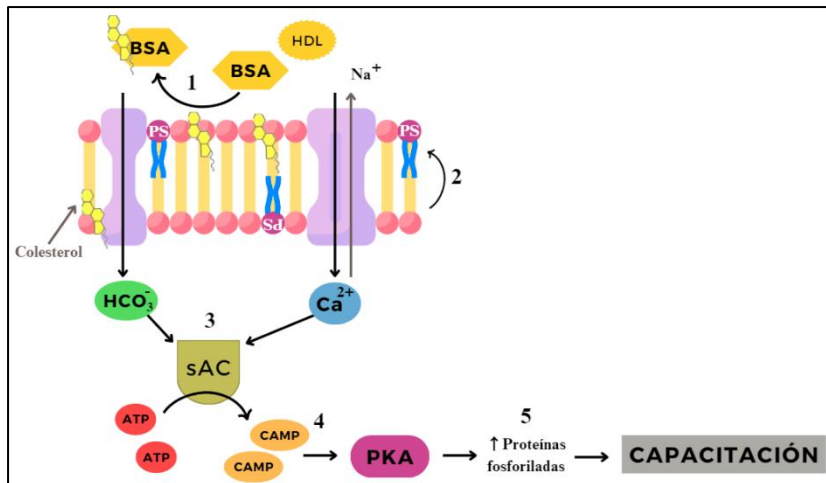


Figura 1. Representación de los eventos producidos durante la capacitación espermática: 1) eliminación del colesterol de la membrana por la albúmina sérica bovina (BSA) o lipoproteínas HDL, 2) traslocación de fosfatidilserina (PS), 3) entrada de calcio y bicarbonato que activan la adenilato ciclasa soluble (sAC), 4) generación de cAMP y activación de la proteína quinasa A (PKA) y 5) fosforilación de proteínas en tirosina. (Elaboración propia basada en (11)).

Una de las consecuencias funcionales de la capacitación es la modificación del patrón de motilidad espermática hacia un tipo de movimiento denominado hiperactivación, que está caracterizado por un movimiento flagelar pronunciado, variación del ángulo de la cabeza del espermatozoide y una trayectoria no lineal. Esto hace que el espermatozoide maximice las probabilidades de encontrar el ovocito y atravesar las capas que lo rodean (12).

2.2.2 Reacción acrosómica

El acrosoma es una vesícula derivada del aparato de Golgi, generada durante el proceso de maduración del espermatozoide en el epidídimo, que contiene gran cantidad de enzimas hidrolíticas. La unión del espermatozoide capacitado a la zona pelúcida es lo que desencadena la reacción acrosómica, que consiste en la fusión entre la membrana plasmática del espermatozoide y la membrana acrosomal externa hasta el segmento ecuatorial, lo que conduce a la liberación del contenido enzimático del acrosoma (6,13). Todo este proceso es llevado a cabo por una compleja señalización celular en la que se activan, al igual que durante la capacitación, proteínas quinasas que fosforilarán proteínas y activarán canales iónicos (13).

Del mismo modo que en la capacitación, el ion calcio es fundamental, tanto para la secreción del contenido vesicular como para la activación de enzimas implicadas en la fusión de membranas. Este calcio no sólo proviene de la entrada desde el medio extracelular, sino también se ha visto que hay una liberación del calcio almacenado en el acrosoma durante la reacción acrosómica (13).

2.2 TÉCNICAS DE BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA EN EL ESPERMATOZOIDE

2.2.1 Proceso de selección espermática: swim-up

La separación de los espermatozoides del plasma seminal que además implique una selección espermática es un procedimiento fundamental para técnicas de reproducción asistida, como la fecundación *in vitro* (FIV), ya que aumenta la probabilidad de éxito de fecundación del ovocito (14). Para ello existen gran cantidad de técnicas como el *Simple Wash* (técnica obsoleta para procedimientos de inseminación artificial (15)), el gradiente de Percoll continuo o discontinuo (16) y el gradiente de Ficoll (17), ambos con un paso de centrifugación, o metodologías sin centrifugación como es la técnica *swim-up*/dextrano (18). En todos los casos se consigue un aumento de la motilidad y viabilidad de la muestra espermática.

Sin embargo, los procesos que incluyen un paso de centrifugación a veces no son los más indicados, especialmente en casos en los que los espermatozoides son particularmente sensibles, como es el caso de los ovinos o humanos, ya que se producen daños en su membrana plasmática. Por ello, el

procedimiento *swim-up*/dextrano es el de elección en estas circunstancias. Esta técnica fue descrita por Álvarez y col. en 1993 para la selección de espermatozoides humanos, siendo en 1995 adaptada por García-López y col. (19) para su utilización en la especie ovina.

Esta técnica implica la generación de dos capas discretas, una de dextrano y otra de albúmina sérica bovina, sin necesidad del paso de centrifugación. Se basa en la habilidad natatoria del espermatozoide y la utilización de un medio viscoso que impide el ascenso al medio de recogida de aquellos que posean daños en la membrana plasmática o problemas en su capacidad de movimiento (19). Mediante esta técnica se consigue, por un lado, la eliminación posibles restos celulares y del plasma seminal de la muestra fresca, que quedan en el fondo del tubo. Esto es importante ya que el contacto prolongado con el plasma seminal puede tener efectos perjudiciales sobre los espermatozoides y, además, contiene factores descapacitantes que van a impedir una adecuada capacitación *in vitro* de dichos espermatozoides. Por otro lado, esta técnica permite obtener una muestra enriquecida en espermatozoides móviles y viables, de mayor calidad (20).

2.2.2 Capacitación *in vitro*

El proceso de capacitación espermática puede llevarse a cabo *in vitro*, simulando las condiciones del tracto reproductor femenino. Para ello, debe utilizarse un diluyente que contenga electrolitos, una fuente de energía para los espermatozoides, como el piruvato, lactato o glucosa, y tres ingredientes clave: bicarbonato (15-25 mM), calcio (1-3 mM) y albúmina sérica (1-10 mg/mL) (11,21). El bicarbonato está implicado en la activación de la adenilato ciclasa soluble (sAC) que, en última instancia, activa la PKA. El aumento de este ion también sustentaría el aumento de la fluidez de la membrana plasmática debido a una redistribución de los lípidos de membrana. Durante la capacitación también se produce una reorganización de esteroides como el colesterol en la zona más apical del espermatozoide, donde receptores de colesterol lo retiran, por lo que, para realizar esta eliminación del colesterol *in vitro*, se añade albúmina al diluyente de capacitación (7). El ion calcio activa, al igual que el bicarbonato, la sAC para iniciar la cascada de señalización del cAMP, por lo que es imprescindible la adición de ambos al diluyente de capacitación para que esta se produzca adecuadamente.

Sin embargo, la capacitación espermática *in vitro* en el espermatozoide ovino resulta mucho más difícil que en otras especies y requiere, además, suplementar el medio con dibutilil-cAMP (db-cAMP), que es un análogo del cAMP, capaz de activar la PKA; inhibidores de fosfodiesterasas como la cafeína y teofilina; metil- β -ciclodextrina (MBCD) como potente receptor de colesterol junto con la BSA (22) y ácido okadaico (OA) como inhibidor de las fosfatasa. Para reproducir las condiciones a las que se ve sometido el espermatozoide durante el tránsito por el tracto reproductor femenino, estos tienen que incubarse en una estufa a 39 °C con un 5% de CO₂ y un 100% de humedad (22). El tiempo de incubación varía entre especies desde 3 a 6 horas, siendo habitual en ovino incubar durante de 3 h (23).

2.2.3 Aglutinación espermática

Un fenómeno observado frecuentemente durante el proceso de capacitación *in vitro* de espermatozoides ovinos, sobre todo en estación no reproductiva, es la aglutinación cabeza con cabeza de los espermatozoides (21). Se ha visto que muchos de los componentes necesarios para que se pueda realizar correctamente la capacitación en esta especie causan esta aglutinación, como por ejemplo la BSA, que, aunque en condiciones normales evita que los espermatozoides se peguen entre sí o al tubo, en condiciones capacitantes podría favorecer su aglutinación, por lo que en ocasiones se sustituye por alcohol polivinílico (PVA (24)). Esta aglutinación parece estar fomentada también por el db-cAMP o por inhibidores selectivos de fosfodiesterasas específicas de cAMP, lo que indicaría que en este fenómeno interviene la cascada de señalización del cAMP (21,22).

El análisis de muestras espermáticas aglutinadas presenta una serie de problemas al utilizar tecnologías de análisis de células individuales como es la citometría de flujo o el análisis computarizado de motilidad. Se han estudiado agentes anti-aglutinantes para solucionarlo, entre los que destaca la D-Penicilamina (DEP). La D-Penicilamina es un tiol nucleofílico capaz de reducir muy eficazmente la aglutinación espermática. Se trata de un compuesto que puede actuar como quelante de metales pesados y antioxidante con poder reductor. De estas características, su capacidad reductora y quelante de cobre parecen ser las responsables de evitar la aglutinación de los espermatozoides debido a su capacidad de reducir los enlaces disulfuro de una proteína espermática de membrana y evitar su unión al ion cobre, ya que esta proteína está implicada precisamente en la aglutinación espermática (21,25).

2.3 ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA DE LA ESPECIE OVINA

La especie ovina se considera una especie estacional de días cortos. En general, su estación reproductiva tiene lugar en otoño e invierno, cuando las horas de luz disminuyen y la duración del día se acorta (26), mientras que la época no reproductiva tiene lugar en primavera y verano. Dado que la gestación de esta especie dura 5 meses, se trataría de una estrategia evolutiva para que las crías nazcan cuando se dan unas buenas condiciones climáticas y nutricionales, con una mayor posibilidad de supervivencia (27).

A pesar de que se han identificado factores ambientales, como la temperatura y precipitaciones, el estado nutricional o las interacciones sociales que regularían la estacionalidad reproductiva, el principal modulador de este proceso es el fotoperiodo, es decir, la cantidad de horas de luz del día, las cuales varían notablemente entre una estación y otra del año (26).

El fotoperiodo regula la secreción de melatonina por la glándula pineal, ya que cuando las señales luminosas activan los fotorreceptores de la retina, se suprime su liberación. Por ello, la melatonina sólo se secreta en horas de oscuridad, es decir, durante la noche. A lo largo del año, la duración de las noches varía, siendo más largas durante el otoño e invierno, y, por tanto, el periodo de secreción de melatonina será mayor. Esta hormona, en el caso de la especie ovina, tiene un efecto estimulador de la reproducción ya que fomenta la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en el hipotálamo, la cual a su vez regula la liberación de la hormona luteinizante (LH) por la hipófisis, que actúa sobre las gónadas femenina y masculina, controlando la actividad ovárica y la producción de espermatozoides, respectivamente (28,29).

La calidad seminal de la especie ovina está influida por esta estacionalidad reproductiva, aunque existen diferencias entre razas y latitud, lo que hace necesario la evaluación de la calidad seminal del semen del morueco individualmente antes de su uso en reproducción para una selección de los mejores machos (30,31). En el caso de las regiones templadas, como es España, la calidad seminal y su capacidad fecundante son mayores en época reproductiva (32).

De forma general, los estudios que han evaluado variaciones en la calidad seminal según la estacionalidad se han centrado en parámetros como la motilidad y viabilidad, observándose valores de estos parámetros mayores en la época reproductiva (30), y dentro de esta una mejor calidad espermática en otoño (principios de la época reproductiva) que en invierno (33).

Por otro lado, en otros estudios en los que se evalúan parámetros no convencionales, tales como el estado de capacitación, presencia de especies reactivas de oxígeno o marcadores apoptóticos como la translocación de fosfatidilserina, indican una mayor calidad seminal en la época reproductiva (34), aunque también se han publicado otros estudios con un pequeño aumento no significativo en época no reproductiva (35).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A pesar de que la especie ovina es estacional (31), el morueco es capaz de producir espermatozoides durante todo el año, aunque, según la mayoría de los estudios, en la época no reproductiva presenta una peor calidad espermática (32).

Pese a que el efecto de la estacionalidad sobre la calidad seminal del morueco ha sido ampliamente estudiado (30,33,36), no existen trabajos publicados en los que se indique cómo afecta este fenómeno a las técnicas de biotecnología reproductiva, como pueden ser la selección espermática por *swim-up* y la capacitación *in vitro* de la especie ovina.

Por ello, el **objetivo principal** de este Trabajo de Fin de Grado fue analizar el efecto de la estacionalidad sobre los resultados de los procesos de selección espermática mediante *swim-up*, y de la capacitación *in vitro* en la especie ovina.

Para llevar a cabo el objetivo principal, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Analizar los cambios en la calidad espermática entre muestras de semen fresco y muestras obtenidas tras el proceso de selección espermática mediante *swim-up* en función de la época del año (reproductiva *vs.* no reproductiva).
2. Evaluar el efecto de la estacionalidad sobre la capacitación *in vitro* de espermatozoides ovinos utilizando dos medios diferentes: TALP y TALP suplementado con un *cocktail* de sustancias capacitantes.
3. Estudiar el efecto del compuesto D-Penicilamina durante la capacitación *in vitro* en muestras de espermatozoides ovinos durante la época no reproductiva.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los compuestos utilizados provienen de la empresa Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, Estados Unidos), a no ser que se mencione lo contrario.

4.1 PROCESADO DE LA MUESTRA ESPERMÁTICA

4.1.1 Obtención de las muestras seminales

En los experimentos se utilizó semen obtenido de nueve moruecos adultos de la raza *Rasa Aragonesa*, extraído mediante vagina artificial por personal competente del Servicio de Apoyo a la Experimentación (SAE) de la Universidad de Zaragoza. Se colectaron dos eyaculados por morueco tras un periodo de abstinencia de 48 horas, realizando los experimentos únicamente con el segundo eyaculado debido a que este presenta una mayor viabilidad y motilidad (37). Además, se trabajó con una mezcla de los segundos eyaculados de todos los moruecos para evitar diferencias que puedan presentarse entre los individuos. Las muestras recogidas se mantuvieron a 37 °C durante su transporte al laboratorio y hasta su posterior manipulación.

4.1.2 Método swim-up/dextrano

La técnica *swim-up*/dextrano utilizada para la elaboración de este trabajo se basa en modificaciones introducidas por García-López y cols. (1996) con respecto al método descrito por Álvarez y cols. (1993), tanto en algunos pasos del proceso como en la composición del medio para poder aplicarla a los espermatozoides ovinos. El medio utilizado fue el medio mHTF (del inglés, *modified Human Tubular Fluid Medium*) compuesto por NaCl 50 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ anhidro 0,4 mM, K₂HPO₄ 0,36 mM, HEPES 21 mM, glucosa 2,8 mM, piruvato 0,33 mM, lactato 18,6 mM, sacarosa 200 mM, pH 6,5, pero sin CaCl₂ y NaHCO₃ para evitar que se produzca la capacitación espermática prematura (38).

El mismo día del experimento se reconstituyó el medio mHTF, a partir del cual se preparó mHTF-DX (30 mg de dextrano/mL de medio mHTF), y mHTF-A (5 mg de albúmina sérica bovina (BSA)/mL de medio mHTF).

Para la realización del *swim-up*, nada más llegar la muestra al laboratorio, se depositaron 500 µL de semen en el fondo de un tubo redondeado, sobre el cual se añadió cuidadosamente la misma cantidad de mHTF-DX. Esta capa de dextrano impide que los espermatozoides con baja motilidad y con alguna alteración en la membrana lo atraviesen y lleguen a la capa superior. Esta capa superior está formada por 1,5 mL de mHTF-A, que se añadieron muy lentamente por las paredes del tubo, quedando sobre la capa de dextrano. La BSA de esta última capa evita la aglutinación y la adhesión a las paredes del tubo de los espermatozoides que han ascendido. Así, las fases quedaron como se muestra en la figura 2.

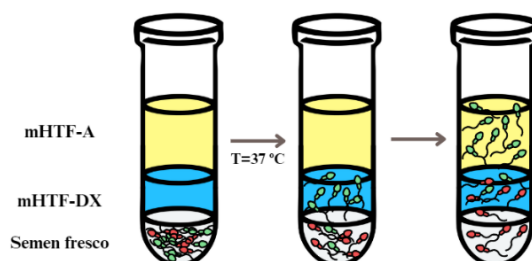


Figura 2. Esquema del proceso de selección espermática con el método *swim-up*/dextrano.

El tubo con la muestra y los medios se dejó incubar a 37 °C en vertical durante 15 minutos, y una vez transcurrido el tiempo se retiraron 750 µL de la capa superior. Esta primera fracción fue desechada, ya que contiene restos del plasma seminal y espermatozoides de baja calidad, y se añadieron de nuevo 750

μL de mHTF-A. Se dejaron transcurrir otros 15 minutos y se repitió este proceso, recogiendo el sobrenadante en un tubo limpio. Tras añadir otros 750 μL de mHTF-A, se realizó nuevamente este proceso dos veces más, obteniéndose finalmente tres fracciones del sobrenadante recogidas de forma conjunta.

4.1.3 Evaluación de la concentración de espermatozoides

La concentración de la muestra espermática seleccionada por *swim-up* se evaluó mediante la cámara de Neubauer, previa dilución 1:100 de los espermatozoides en agua miliQ para inducir la rotura de la membrana plasmática y detener el movimiento espermático.

4.1.4 Capacitación *in vitro*

Los espermatozoides obtenidos por *swim-up* fueron capacitados *in vitro* en dos medios distintos: medio TALP (*Tyrode's albumin lactate pyruvate*), que se utiliza para inducir la capacitación *in vitro* en muchas especies (39), y medio TALP suplementado con compuestos (que denominamos *cocktail*) que inducen la capacitación espermática en la especie ovina, difícil de capacitar *in vitro* (22). En ambos casos se utilizó una concentración de $1,6 \cdot 10^8$ espermatozoides/mL. La composición del medio TALP fue NaCl 100 mM, KCl 3,1 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,3 mM, lactato sódico 21,6 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,4 mM, HEPES 10 mM, piruvato sódico 0,4 mM, CaCl_2 4 mM, NaHCO_3 25 mM y BSA 5 mg/mL (p/v), pH 7,3.

A su vez, el “medio *Cocktail*” estaba formado por medio TALP al que se le añadió teofilina 1 mM, cafeína 1 mM, MBCD 2,4 mM, db-cAMP 1 mM y ácido okadaico 0,2 μM.

Debido a que en algunos experimentos realizados en la época no reproductiva se produjo una aglutinación de los espermatozoides durante la incubación en condiciones capacitantes, se realizaron otra serie de experimentos en medio TALP y *Cocktail*, suplementados con 5 μL de D-Penicilamina (DEP) 100 mM (concentración final 1 mM), un compuesto que evita la aglutinación espermática al añadirlo en medio capacitante (21).

En todos los casos las muestras, se incubaron en una estufa a 39 °C, en 100% de humedad y con un 5% de CO_2 durante 3 h, volteándolas suavemente cada hora para evitar la sedimentación de los espermatozoides en el fondo del tubo.

4.2 EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS

Se evaluó la calidad espermática de los siguientes grupos experimentales:

- Fresco: muestra de semen eyaculada, sin tratar, que consta del plasma seminal y los espermatozoides.
- *Swim-up*: espermatozoides libres de plasma seminal sin incubar en condiciones capacitantes.
- TALP: espermatozoides seleccionados por *swim-up* incubados en medio TALP en condiciones capacitantes. Sirve como control de la capacitación.
- *Cocktail*: espermatozoides seleccionados por *swim-up* incubados en medio *Cocktail* en condiciones capacitantes
- TALP-DEP: espermatozoides seleccionados por *swim-up* incubados en medio TALP suplementado con D-Penicilamina en condiciones capacitantes
- *Cocktail*-DEP: espermatozoides seleccionados por *swim-up* incubados en medio *Cocktail* suplementado con D-Penicilamina en condiciones capacitantes

Los parámetros espermáticos analizados fueron la motilidad espermática, la viabilidad o integridad de la membrana plasmática, el estado apoptótico, el estrés oxidativo y el estado de capacitación.

4.2.1 Análisis de la motilidad espermática

Para este análisis se utilizó un sistema automatizado de análisis espermático asistido por ordenador o sistemas CASA (del inglés *Computer Assisted Sperm Analysis*), concretamente el programa ISAS 1.0.4 (*Integrated Semen Analysis System*, Proiser SL, Valencia, España), que permite calcular el porcentaje de espermatozoides que se mueven, así como el tipo de movimiento y su velocidad.

Para ello se realizó una dilución 1:100 en el caso del semen fresco, 2:25 para la muestra *Swim-up* y 1:5 para las muestras obtenidas tras la capacitación (TALP, *Cocktail*, TALP-DEP y *Cocktail*-DEP), en medio bifase (sacarosa 250 mM, HEPES 100 mM, EGTA 100 mM, TPNa 500 mM). De esta dilución se depositó una gota de 8 µL en un portaobjetos y un cubreobjetos, ambos atemperados a 37 °C. Para la evaluación se colocó la muestra sobre la platina térmica de un microscopio de contraste de fases (Nikon eclipse 50i), equipado con una cámara de video acoplada (Proiser SL) y utilizando el objetivo de 10x. De este modo se grabaron imágenes seriadas durante 1 segundo a 25 fotogramas por segundo en el ordenador al que está conectado y se analizó la trayectoria que siguen los espermatozoides mediante el programa ISAS 1.0.4.

En todas las muestras se grabaron cinco campos por gota y se recogieron los valores de motilidad total (MT, porcentaje de espermatozoides que se mueven), de motilidad progresiva (MP, porcentaje de espermatozoides que siguen una trayectoria rectilínea) y de rápidos (R, espermatozoides con una velocidad de desplazamiento curvilínea (VCL) > 75 µm/s).

4.2.2 Estudio de la viabilidad celular

La viabilidad o integridad de la membrana espermática se evaluó utilizando dos fluorocromos combinados: yoduro de propidio (IP) y diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) (40).

El CFDA es un compuesto no fluorescente permeable a través de la membrana plasmática del espermatozoide, el cual es convertido por las esterasas citoplasmáticas en carboxifluoresceína, un fluoróforo verde incapaz de atravesar la membrana intacta debido a su carga, de modo que queda atrapado en el interior de las células viables. Por otro lado, los espermatozoides no viables quedan teñidos por IP, ya que este compuesto es capaz de penetrar sólo en el interior de las células cuya membrana plasmática está dañada, uniéndose al ADN y emitiendo fluorescencia roja. Por último, se adiciona formaldehído, para fijar las células para su evaluación.

Para esta tinción, las muestras se diluyeron en medio bifase a una dilución 1:500 el semen fresco, 1:60 la muestra de *swim-up* y 1:6 las de TALP, *Cocktail*, TALP-DEP y *Cocktail*-DEP. A estas diluciones se les añadieron 3 µL de CFDA (10 µM en DMSO), 3 µL de IP (7,3 µM en agua destilada) y 3 µL de formaldehído al 0,5% (v/v). Tras una incubación de 15 minutos, se evaluaron mediante el citómetro de flujo FC 500 (Beckman Coulter, Brea, California, Estados Unidos) con un láser de argón a 488 nm. Se utilizan los filtros FL1-525 ± 5 nm (para CFDA) y FL4-675 ± 5 nm (para IP), analizando 20.000 eventos por muestra.

Se obtuvieron cuatro subpoblaciones de espermatozoides en función de la tinción, considerando el cuadrante IP-/CFDA+ como células viables.

4.2.3 Análisis del estrés oxidativo (niveles de ROS)

El estrés oxidativo viene determinado por un desequilibrio entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y su eliminación por antioxidantes. Su análisis se realizó por citometría de flujo, utilizando H₂DCFDA (diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína) y yoduro de propidio (IP).

El H₂DCFDA es una molécula no fluorescente que, al igual que el CFDA, atraviesa la membrana plasmática y por acción de las esterasas intracelulares, que disocian grupos de acetato, e interacción con ROS como H₂O₂, se transforma en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), un fluorocromo verde, que es incapaz de atravesar la membrana plasmática, y por tanto queda retenido en el interior celular.

Para la detección de ROS, las distintas muestras se diluyeron en medio bifase (Fresco 1:500, *Swim-up* 1:60, y TALP, *Cocktail*, TALP-DEP y *Cocktail*-DEP 1:6), y se añadieron 5 µL de H₂DCFDA (1 mM) a las muestras Fresco y *Swim-up* o 3 µL de H₂DCFDA de las muestras de capacitación, 2 µL de IP (7,3 µM) y 3 µL de formaldehído al 0.5% (v/v) para fijar las células.

Tras una incubación de 15 minutos, se analizaron por citometría de flujo, obteniendo cuatro subpoblaciones de espermatozoides en base a la tinción, considerando los eventos del cuadrante IP-/H₂DCFDA- como espermatozoides con baja concentración de ROS, que son los que se incluyeron en los resultados de este trabajo.

4.2.4 Evaluación del estado apoptótico

Entre los eventos relacionados con la apoptosis en los espermatozoides destaca la translocación de la fosfatidilserina, un fosfolípido que, en condiciones normales, se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y, sin embargo, en células apoptóticas se presenta en la cara externa. Para evaluar esta translocación se realiza un marcaje mediante anexina, una proteína que presenta gran afinidad por la fosfatidilserina.

La anexina utilizada en estos experimentos es Anexina-V acoplada a un fluorocromo verde (FITC-Anexina, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), de forma que se marcan con este fluorocromo aquellos espermatozoides apoptóticos con translocación de la fosfatidilserina. Este compuesto se combinó con yoduro de propidio (IP), que identifica las células con la membrana dañada.

Para su evaluación, se realizaron las diluciones de las muestras con tampón de anexinas 1X (10X *Binding Buffer Apoptosis Detection Kit*, diluido 1:10 en agua miliQ). En el caso de la muestra fresca se realizó una dilución 1:600, 1:30 del *Swim-up* y 1:6 de TALP, *Cocktail*, TALP-DEP y *Cocktail*-DEP. A cada una de estas diluciones se les añadieron 2 µL de FITC-Anexina, 3 µL de IP (7,3 µM) y 5 µL de formaldehído al 0.5% (v/v). Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 37 °C y en oscuridad, y posteriormente se analizaron mediante citometría de flujo.

Tras el análisis por citometría se obtienen cuatro subpoblaciones celulares, teniendo en cuenta para este trabajo la población IP-/Anexina-, que son los espermatozoides viables sin inversión de fosfatidilserina.

4.2.5 Evaluación del estado de capacitación

El estado de capacitación de la muestra se evaluó por microscopía y Western blot.

4.2.5.1 Estudio de los niveles intracelulares del calcio mediante tinción con clorotetraciclina (CTC)

La evaluación del estado de capacitación por tinción con clorotetraciclina (CTC) (41) se basa en que este antibiótico es capaz de penetrar en el espermatozoide y unirse al calcio libre, generando unos patrones de fluorescencia característicos en base a la distribución intracelular de este catión. Esto permite diferenciar entre los distintos estados fisiológicos del espermatozoide: no capacitado, capacitado y aquellos en los que se ha producido la reacción acrosómica (42). En este trabajo se utilizó una versión modificada del ensayo descrito por Ward y Storey, validada para semen ovino (43).

Para ello, el día del experimento se preparó la solución de trabajo de CTC: 750 µM de CTC en un tampón compuesto por NaCl 130 mM, Tris 20 mM y L-Cisteína 5 µM, pH 7,8 y esterilizado por filtración

mediante un filtro de 0,22 μm (Milipore Ibérica). Se tomaron 20 μL de cada una de las muestras, a las que se añadió 20 μL de la solución de trabajo y 4 μL de paraformaldehído al 1,25% (p/v) para fijar las células. Las preparaciones se incubaron 30 minutos a 4 °C en oscuridad, tras lo cual se depositó una gota de 10 μL de cada una de ellas en un portaobjetos junto con una gota de trietilendiamina (DABCO 0,22 M en solución Glicerol:PBS (9:1, v/v)), que permite conservar la fluorescencia. Finalmente, se colocó un cubreobjetos y utilizando esmalte transparente se selló la preparación. Este procedimiento se realizó en semioscuridad.

Las muestras se congelaron al menos durante 24 horas para aumentar su fluorescencia, y posteriormente se evaluaron utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon eclipse E400) equipado con un filtro V-2A (420-490 nm de excitación y 510 nm de emisión) y objetivo de inmersión 100x. Para ello, se analizaron 200 espermatozoides por muestra, clasificándolos en tres estados de capacitación en función de su patrón de fluorescencia (Figura 3): no capacitados (NC), con distribución de tinción uniforme en toda la cabeza; capacitados (C), teñidos solamente en el acrosoma; y espermatozoides reaccionados (R) que carecen de fluorescencia en la cabeza o poseen únicamente en la zona ecuatorial una banda de fluorescencia.

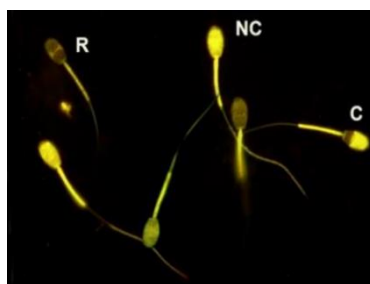


Figura 3. Representación de espermatozoides ovinos teñidos con clorotetraciclina (CTC) y evaluados mediante un microscopio de fluorescencia con filtro V-2A y 1000x aumentos. Se pueden distinguir los espermatozoides capacitados (C), no capacitados (NC) y reaccionados (R).

4.2.5.1 Análisis de fosfotirosinas mediante la técnica Western blot

Para la extracción de las proteínas espermáticas se llevó a cabo la metodología descrita por Colás y col. (2008). Se tomaron 200 μL de cada muestra: Fresco 1:40 en PBS (NaCl 3,13 g/l, KCl 0,2 g/l, Na_2HPO_4 1,44 g/l, KH_2PO_4 0,24 g/l, pH 7,4), *Swim-up* 1:3 en PBS y las muestras de capacitación sin diluir, todas ellas a una concentración final de $1 \cdot 10^8$ espermatozoides/mL, y se mezclaron con 100 μL de medio de extracción de proteínas (ESB, *Extraction Sample Buffer*), compuesto por SDS al 2% (p/v), Tris-HCl 0,0626 mM a pH 6,8 e inhibidores de proteasas y fosfatasa a una concentración final de 1% (v/v). Esta mezcla se incubó a 100 °C durante 5 minutos en un baño de arena. Tras ello se centrifugó a 15.000 g durante 5 minutos, se recogió el sobrenadante y se congeló a -20 °C hasta su posterior análisis.

Para la separación de las proteínas, se mezclaron 10 μL de tampón de carga (β -mercaptoetanol a concentración final del 5% (v/v), glicerol a concentración final del 1% (v/v) y azul de bromofenol a concentración final de 0,002% (p/v)), junto con 10 μL de muestra de proteínas extraídas. La separación de proteínas se llevó a cabo mediante electroforesis en una dimensión utilizando geles de poliacrilamida al 4-15% y 1 mm de espesor (Mini-PROTEAN® TGXT™ Precast Protein Gels, Bio-Rad, Hércules, California, Estados Unidos). Se cargaron 5 μL de marcador de pesos moleculares de 10 a 250 kDa (Bio-Rad) en el primer pocillo de cada gel, y 10 μL de cada muestra en los pocillos restantes. Las condiciones de electroforesis fueron 110 V durante 120 minutos a 4 °C. Tras la separación de las proteínas, se realizó una transferencia semiseca de las mismas a una membrana de PVDF, mediante el sistema Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad), utilizando el modo de transferencia adecuado para proteínas de alto peso molecular, que son las de interés en este trabajo.

A continuación, se bloquearon los sitios de unión no específicos de la membrana incubándola en PBS con 5% de BSA (p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación.

Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo primario anti-fosfotirosina (Clone 4G10®) generado en ratón y diluido 1:1000 en PBS-Tween 1% BSA (0,1% Tween-20 (p/v) en PBS con 1% (p/v) de BSA) y el anticuerpo control de carga anti-actina de conejo diluido 1:500 también en PBS-Tween 1% BSA. Las membranas se incubaron toda la noche con ambos anticuerpos a 4 °C.

Tras tres lavados de 15 minutos con PBS-Tween en agitación, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios (IRDye® 800CW Donkey anti-Mouse e IRDye® 680RD Donket anti-Rabbit), diluidos 1:15.000 en PBS-Tween 1% BSA, durante 1 hora y 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

Para finalizar, las membranas se revelaron utilizando el sistema Odyssey Clx *Infrared Imaging System* (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, Estados Unidos), obteniendo imágenes de Western blot en base a la fluorescencia emitida por los anticuerpos secundarios. La señal detectada a partir de todas las proteínas de alto peso molecular se cuantificó para determinar el grado de fosforilación en residuos de tirosina de las proteínas. Para verificar que la transferencia se había producido adecuadamente, se tiñeron las membranas con azul de Coomassie durante 10 minutos en agitación y se destiñeron con tampón decolorante (metanol al 30% y ácido acético glacial al 10%) durante 1 hora.

4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos se realizaron en determinados meses dentro de la época reproductiva (de octubre a diciembre) y no reproductiva (de marzo a abril). Los resultados se muestran como media \pm SEM del número de experimentos (n=6) realizados en cada época. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con el software GraphPad Prism 8.0.1 (Boston, Massachusetts, Estados Unidos), utilizando el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para determinar la existencia de diferencias significativas entre épocas y grupos experimentales.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 EFECTO DE LA ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA SOBRE LA SELECCIÓN ESPERMÁTICA

Para evaluar el efecto de la estacionalidad reproductiva sobre la selección espermática llevada a cabo mediante el método *swim-up*/dextrano, se realizó este procedimiento en ambas épocas, reproductiva (ER) y no reproductiva (ENR), y se analizó la calidad seminal antes y después de este proceso.

En el caso de la **motilidad total**, se observó un descenso significativo ($P<0,05$) entre la muestra fresca (Fresco) y la muestra *Swim-up* en ambas estaciones del año (figura 4). Estudios previos han mostrado que la mejora de la motilidad total tras el *swim-up* depende de la calidad de la muestra inicial, mejorándola en muestras con motilidades inferiores al 60%, y de forma menos acusada en muestras con motilidades por encima del 80% (García-López y col. 1995). En este trabajo se observaron motilidades iniciales del semen fresco de entre 75-90%, por lo que el método de selección espermática no tiene mucho margen de mejora. Además, en nuestro caso, las muestras fueron evaluadas mediante el sistema automatizado CASA y en el trabajo anterior de forma subjetiva, lo que podría explicar la diferencia en los resultados. Aun así, el hecho de que la motilidad descienda resulta sorprendente y podría ser debido a pequeñas fluctuaciones de temperatura durante el proceso.

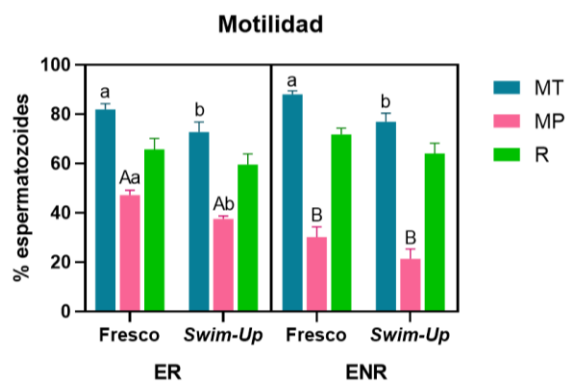


Figura 4. Porcentaje de espermatozoides móviles totales (MT), móviles progresivos (MP) y rápidos (R) en muestras de semen fresco (Fresco) y espermatozoides seleccionados mediante *swim-up*/dextrano (*Swim-up*), tanto en época reproductiva (ER) como en época no reproductiva (ENR). Los valores se muestran como media \pm error estándar de la media ($n=6$). Las letras minúsculas (a, b) implican diferencias significativas ($P<0,05$) entre grupos experimentales dentro de la misma época, mientras que las letras mayúsculas (A, B) hacen referencia a diferencias significativas entre épocas ($P<0,05$).

En cuanto al efecto de la estacionalidad sobre la motilidad total, no se observaron diferencias entre épocas ni en la muestra fresca ni en la seleccionada por *swim-up*. Un estudio previo llevado a cabo también con la raza *Rasa Aragonesa* tampoco encontró diferencias significativas en semen fresco entre épocas (35). En otros estudios este resultado también se corroboró (44).

En cuanto a la **motilidad progresiva**, que implica el avance rectilíneo del espermatozoide, fundamental para atravesar el tracto reproductor de la hembra, se observaron diferencias significativas ($P<0,05$) tras el *swim-up* en ER (figura 4). Este descenso en comparación con la muestra fresca podría deberse a la existencia de un mayor número de espermatozoides capacitados en la muestra *swim-up*, ya que con la hiperactivación asociada a la capacitación se modifica su patrón de movimiento. Además, este resultado ya se había observado en trabajos previos del grupo de investigación, aunque en ambas épocas (45).

Además, se encontraron diferencias significativas ($P<0,01$) en la motilidad progresiva entre ER y ENR, siendo mayor en la primera. La época reproductiva es el momento del año en que la especie ovina se reproduce de forma natural, por lo que una mayor motilidad progresiva en esta época mejoraría las probabilidades de fecundación (46).

En cuanto al porcentaje de **espermatozoides rápidos**, no se encontraron diferencias significativas ni entre épocas, ni entre Fresco y *Swim-up*.

La evaluación de la **viabilidad** reveló un mayor porcentaje de espermatozoides viables en muestras frescas (Fresco) de ENR ($P<0,05$) (figura 5.A), como se observó en estudios previos (35). En lo que respecta al proceso de selección espermática, no hubo diferencias significativas entre las muestras Fresco y *Swim-up*, ni en ER ni ENR, ya que la viabilidad de las muestras de partida era ya elevada (80-90%) y por ello el incremento del parámetro no fue tan acusado, como se vio en estudios previos (19,47,48).

En relación al **daño oxidativo** y el **estado apoptótico**, no se detectaron diferencias significativas entre épocas en el porcentaje de espermatozoides viables con bajos niveles de ROS (figura 5.B) ni en espermatozoides viables sin inversión de fosfatidilserina (figura 5.C), como se observó en otro estudio del grupo (35). Tampoco hubo diferencias significativas entre Fresco y *Swim-up* en ambos parámetros. Este resultado contrasta con estudios previos, que indican una reducción significativa en el número de espermatozoides con inversión de fosfatidilserina tras realizar la técnica *swim-up*/dextrano (47,49).

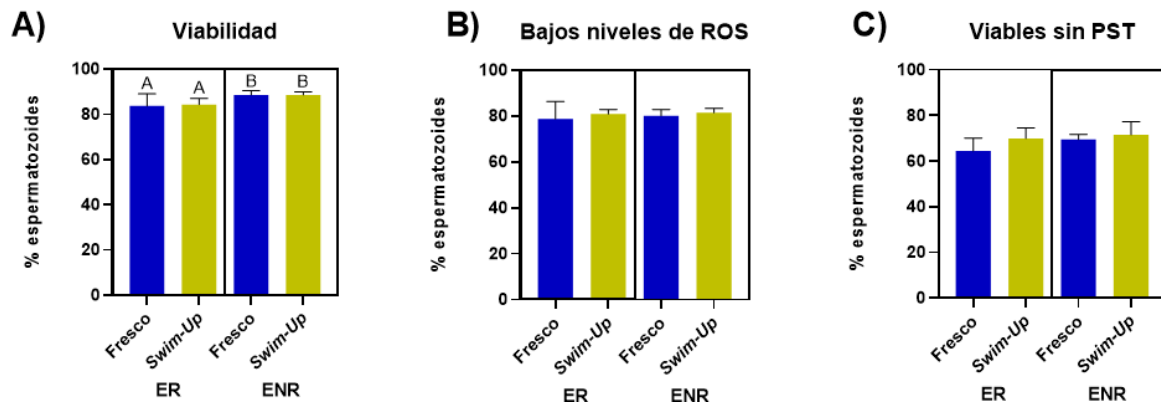


Figura 5. Porcentaje de espermatozoides viables (A), viables con bajos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) (B) y viables sin translocación de fosfatidilserina (PST) (C) en muestras de semen fresco (Fresco) y espermatozoides seleccionados mediante *swim-up*/dextrano (*Swim-up*), tanto en época reproductiva (ER) como en época no reproductiva (ENR). Los valores se muestran como media \pm error estándar de la media ($n=6$). Las letras mayúsculas (A, B) implican diferencias significativas entre épocas.

En relación al **estado de capacitación** (figura 6) se observó una disminución significativa de espermatozoides no capacitados (NC) ($P<0,0001$ en ER y $P<0,01$ en ENR) y un aumento de capacitados (C) ($P<0,0001$ en ER y $P<0,01$ en ENR) tras el *swim-up*. Estudios anteriores hacen referencia a una recuperación de los espermatozoides no capacitados tras esta técnica (47); sin embargo, esto contrasta con lo observado en este trabajo y podría deberse a la presencia de albúmina sérica bovina (BSA) en el medio de recogida del *swim-up*, ya que existen estudios que indican que este compuesto es capaz de mediar la capacitación gracias a su actividad como aceptor de esteroides (8).

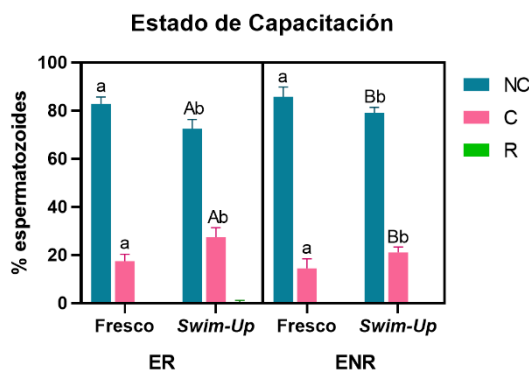


Figura 6. Porcentaje de espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (C) y reaccionados (espermatozoides que han llevado a cabo la reacción acrosómica) (R) en muestras de semen fresco (Fresco) y espermatozoides seleccionados mediante *swim-up*/dextrano (*Swim-up*), tanto en época reproductiva (ER) como en época no reproductiva (ENR). Los valores se muestran como media \pm error estándar de la media ($n=6$). Las letras minúsculas (a, b) indican diferencias significativas entre grupos experimentales dentro de la misma estación y las mayúsculas (A, B) implican diferencias significativas entre épocas dentro del mismo grupo experimental.

Al comparar entre ER y ENR, se observaron diferencias entre estaciones en la muestra fresca, aunque se encontró un mayor porcentaje de espermatozoides NC y, por tanto, un menor porcentaje de C ($P < 0,01$) en la muestra *Swim-up* obtenida en ENR. Esto explicaría el menor porcentaje de espermatozoides móviles progresivos obtenidos en esta muestra (figura 4), ya que estaría relacionado con una hiperactivación espermática, como se ha comentado previamente.

Durante la capacitación se fosforilan en residuos de tirosina gran cantidad de proteínas, que fueron estudiadas mediante Western blot. En concreto se cuantificaron las proteínas fosforiladas de alto peso molecular, que son las de interés en la capacitación.

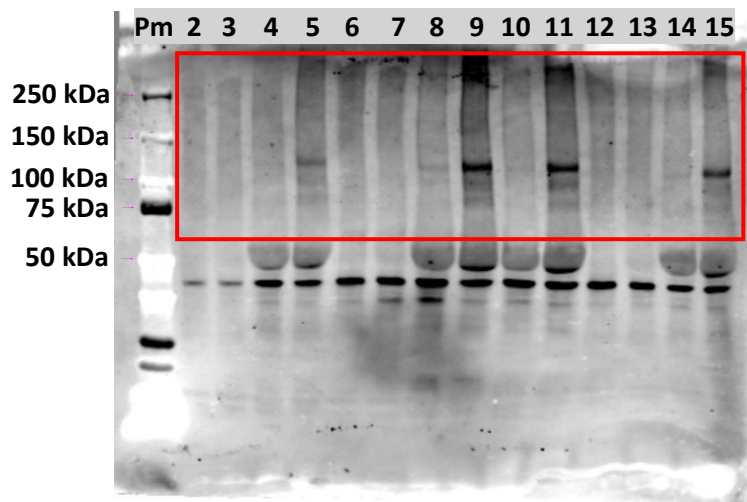


Figura 7. Western blot representativo del análisis de fosforilación en residuos de tirosinas de proteínas espermáticas de células provenientes de muestra fresca (carriles 2, 6 y 12), seleccionadas por *swim-up* (carriles 3, 7 y 13) y tras tres horas de incubación en condiciones capacitantes (5% CO₂, 100% humedad y 39 °C) en medio TALP (carriles 4, 8 y 14), medio *Cocktail* (carriles 5, 9 y 15), medio TALP suplementado con D-Penicilamina (carril 10) y medio *Cocktail* suplementado con D-Penicilamina (carril 11). El recuadro rojo hace referencia a todas las proteínas de alto peso molecular que fueron analizadas.

No se observaron diferencias significativas en la **fosforilación de proteínas en tirosina** entre muestras (Fresco y *Swim-up*) ni tampoco entre estaciones (figura 8). Estudios previos habían demostrado un incremento significativo entre la muestra de semen fresco y tras *swim-up* (50), aunque esos estudios fueron realizados en muestras humanas. En nuestro caso, a pesar de que los análisis de CTC mostraron un aumento de los espermatozoides capacitados en la muestra *Swim-up* en ER y ENR, este es un marcador temprano de la capacitación, y dado que la selección espermática por *swim-up* en la especie ovina se realiza en aproximadamente una hora en condiciones no capacitantes, la fosforilación en residuos de tirosina no da tiempo a que se produzca (11).

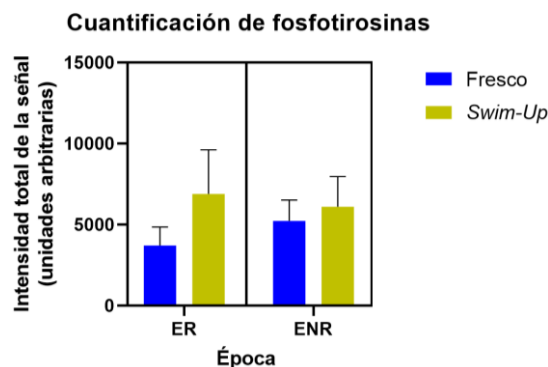


Figura 8. Cuantificación por densitometría de las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina presente en las muestras de semen fresco (Fresco) y espermatozoides seleccionados mediante *swim-up*/dextrano (*Swim-up*), tanto en época reproductiva (ER) como en época no reproductiva (ENR). Los resultados se muestran como media \pm error estándar de la media ($n=6$).

5.2 EFECTO DE LA ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA SOBRE LA CAPACITACIÓN *IN VITRO* DE ESPERMATOZOIDES OVINOS

El procedimiento de capacitación espermática ovina *in vitro* presenta ciertas dificultades, por lo que, a diferencia de otras especies en las que se utiliza el medio TALP (51) o una variación de este (39), para el morueco se requiere la suplementación de este medio con un *cocktail* de sustancias (22). En este trabajo se incubaron las muestras en medio TALP y TALP+*cocktail* (*Cocktail*) para su comparación.

Las muestras de capacitación procedían de la muestra *Swim-up*, por lo que, tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes, se observó un descenso significativo ($P<0,05$) entre la muestra seleccionada y las muestras TALP y *Cocktail* en todos los parámetros estudiados (motilidad, viabilidad, vivos con bajos niveles de ROS, vivos sin translocación de fosfatidilserina y espermatozoides NC). Este efecto se observó en múltiples trabajos previos (45,52) y no se ha referido en la presente memoria para no enmascarar las diferencias entre épocas o medios.

En cuanto al efecto de la estacionalidad reproductiva durante la capacitación *in vitro*, no se observaron diferencias significativas entre épocas en lo que respecta a la **motilidad** tras la capacitación en medio TALP y *Cocktail*. Aun así, todos los parámetros de motilidad se vieron reducidos en muestras capacitadas en medio *Cocktail* con respecto al medio TALP, en concordancia con lo observado en estudios previos (45), aunque el descenso sólo fue significativo en el caso de la motilidad progresiva en ER (figura 9). Sin embargo, la caída de este valor en las muestras capacitadas en medio *Cocktail* se debió a la aglutinación cabeza con cabeza de la mayoría de las muestras, especialmente en la ENR, que impedía su correcta evaluación por el software CASA.

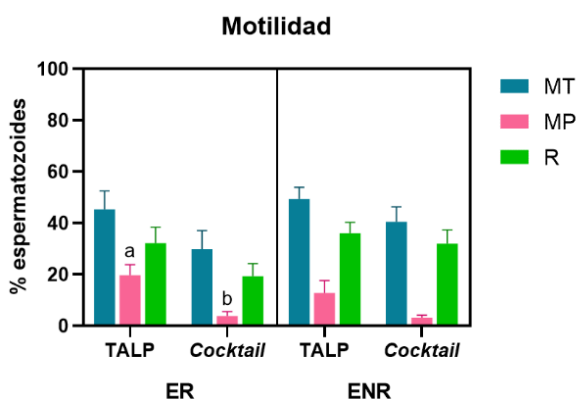


Figura 9. Porcentaje de espermatozoides mótils totales (MT), mótils progresivos (MP) y rápidos (R) en muestras capacitadas en medio TALP y *Cocktail*, tanto en época reproductiva (ER) como en época no reproductiva (ENR). Los valores se muestran como media \pm error estándar de la media ($n=6$). Las letras minúsculas (a, b) implican diferencias significativas entre grupos experimentales dentro de la misma época.

Al evaluar la **viabilidad** (figura 10.A) no se observaron diferencias significativas entre estaciones en ninguno de los medios de capacitación. Tampoco hubo diferencias significativas entre estaciones en los porcentajes de espermatozoides **viables con bajos niveles de ROS** (figura 10.B) o **sin inversión de fosfatidilserina** (figura 10.C) en muestras capacitadas en medio *Cocktail*, aunque sí en medio TALP ($P<0,01$ y $P<0,05$ para ROS y PST respectivamente), siendo estos valores menores en ENR.

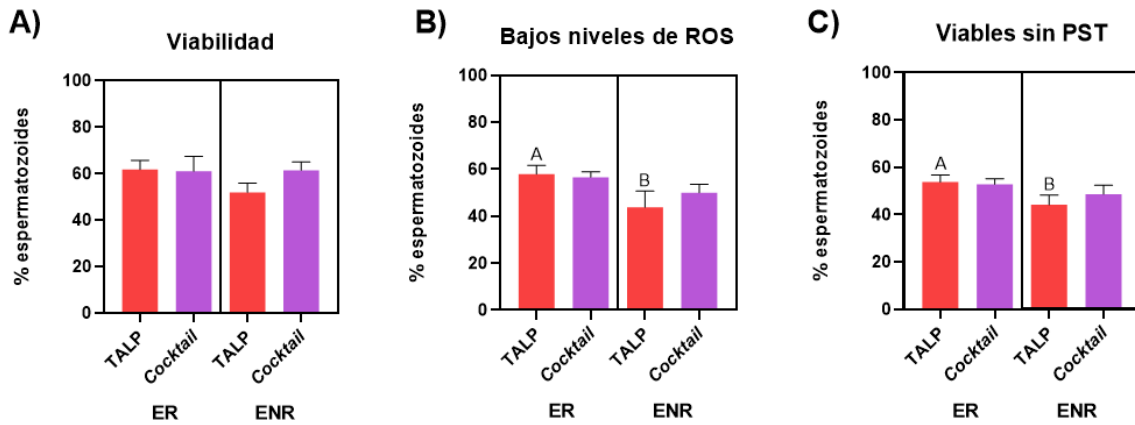


Figura 10. Porcentaje de espermatozoides viables (A), viables con bajos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) (B) y viables sin translocación de fosfatidilserina (PST) (C) en muestras capacitadas en medio TALP y *Cocktail*, tanto en época reproductiva (ER) como en época no reproductiva (ENR). Los resultados se muestran como media \pm error estándar (n=6). Las letras mayúsculas (A, B) implican diferencias significativas entre distintas estaciones del año.

Finalmente, el medio de capacitación (TALP o *Cocktail*) no afectó al porcentaje de viabilidad, viables con bajos niveles de ROS o viables sin inversión de fosfatidilserina en ninguna de las estaciones estudiadas, en concordancia con estudios previos (45,52,53).

Al analizar los resultados de **capacitación** (figura 11), se observó una disminución de los espermatozoides no capacitados (NC) ($P < 0,05$ en ER y $P < 0,001$ en ENR) y un aumento de los espermatozoides capacitados (C) ($P < 0,05$ en ER y $P < 0,01$ en ENR) entre el medio *Cocktail* comparado con el medio TALP, como era esperable, ya que el primero contiene sustancias que aumentan el cAMP intracelular y, por tanto, disparan el proceso de capacitación en espermatozoides ovinos (22) como se ha comentado anteriormente. Sin embargo, también se detectó un efecto estacional en este proceso, de forma que en ENR, la incubación en medio TALP presenta un mayor porcentaje de espermatozoides NC ($P < 0,05$) y un menor porcentaje de reaccionados ($P < 0,001$) en comparación con la ER. Sin embargo, la estacionalidad reproductiva no parece afectar a los resultados de capacitación cuando el proceso se realiza en medio *Cocktail*.

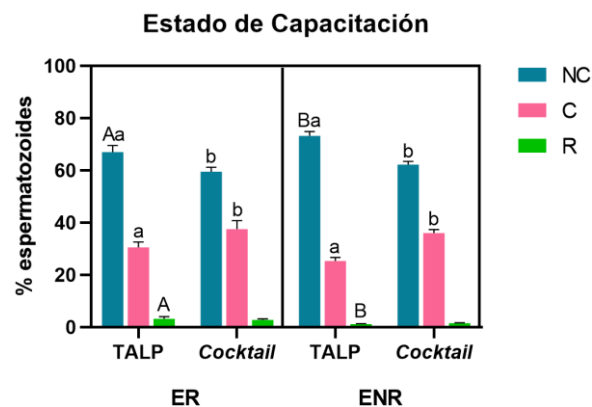


Figura 11. Porcentaje de espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (C) y reaccionados (R) en muestras capacitadas en medio TALP y *Cocktail*, tanto en época reproductiva (ER) como en época no reproductiva (ENR). Los valores se muestran como media \pm error estándar de la media (n=6). Las letras (a, b) minúsculas indican diferencias significativas entre grupos experimentales dentro de la misma estación y las mayúsculas (A, B) implican diferencias significativas entre épocas del año dentro del mismo grupo experimental.

El análisis por Western blot de las **proteínas fosforiladas en residuos de tirosina** mostró un aumento significativo en la fosforilación en las muestras capacitadas en medio *Cocktail* cuando se compararon con las incubadas en TALP, tanto en ER ($P < 0,05$) como en ENR ($P < 0,001$). Estos resultados respaldan

los obtenidos mediante tinción con CTC, ya que hubo un mayor porcentaje de espermatozoides capacitados en la muestra *Cocktail* y concuerdan con trabajos previos del grupo (22). Además, la fosforilación en residuos de tirosina en medio *Cocktail* fue mayor en ENR que en ER ($P<0,05$), sin que hubiese diferencias entre estaciones cuando la capacitación se realizaba en medio TALP.

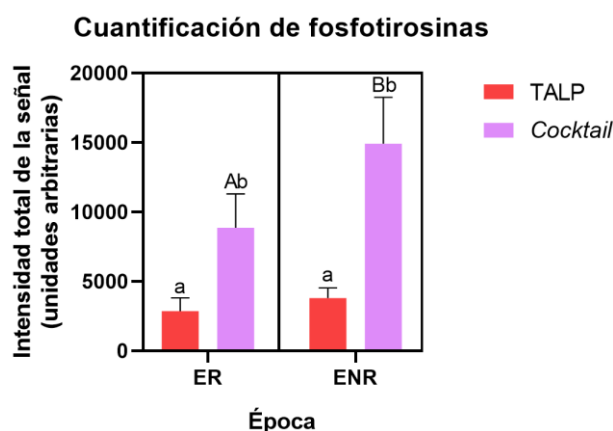


Figura 12. Cuantificación por densitometría de las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina presente en las muestras capacitadas en medio TALP y *Cocktail*, tanto en época reproductiva (ER) como en época no reproductiva (ENR). Los resultados se muestran como media \pm error estándar de la media ($n=6$). Las letras minúsculas (a, b) indican diferencias significativas entre grupos experimentales dentro de la misma estación y las letras mayúsculas (A, B) diferencias entre estaciones dentro del mismo grupo experimental.

5.3 EFECTO DEL COMPUESTO ANTI-AGLUTINANTE D-PENICILAMINA SOBRE LA CAPACITACIÓN *IN VITRO* DE ESPERMATOZOIDEOS OVINOS DURANTE LA ÉPOCA NO REPRODUCTIVA

Dado que durante la ENR se producía la aglutinación cabeza-cabeza de los espermatozoides que impedía su correcta evaluación, se suplementaron tanto el medio TALP como el medio *Cocktail* con D-Penicilamina, un compuesto anti-aglutinante.

El uso del compuesto D-Penicilamina no tuvo efectos significativos en la **motilidad**, tanto total como progresiva o el porcentaje de espermatozoides rápidos, aunque sí que se produjo un ligero aumento de la mayoría de los parámetros de motilidad cuando se añadió este compuesto, como se describe en el artículo de Leahy y col. de 2016 (figura 13).

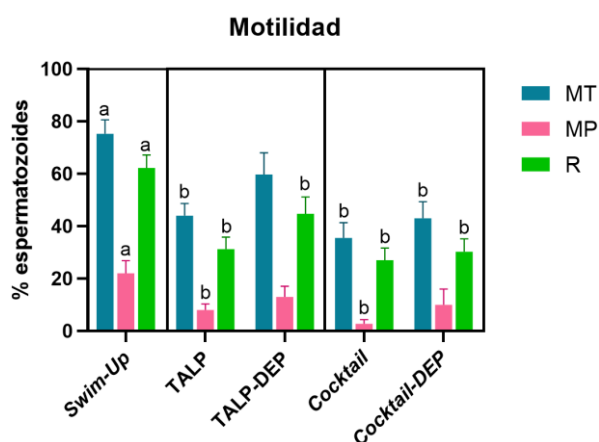


Figura 13. Porcentaje de espermatozoides móviles totales (MT), móviles progresivos (MP) y rápidos (R) en muestras capacitadas en medio TALP y *Cocktail*, suplementadas o no con D-Penicilamina (DEP) en estación no reproductiva (ENR). Los valores se muestran como media \pm error estándar de la media ($n=4$). Las letras minúsculas (a, b) implican diferencias significativas entre grupos experimentales.

El uso de D-Penicilamina mejoró la **viabilidad** (figura 14.A) de las muestras tanto incubadas en medio TALP ($P<0,0001$) como en medio *Cocktail* ($P<0,05$). En el caso de los espermatozoides **viabiles con bajos niveles de ROS** (figura 14.B) y **viabiles sin inversión de fosfatidilserina** (figura 14.C) la adición de D-Penicilamina únicamente aumentó estos valores en las muestras capacitadas en TALP ($P<0,001$ y $P<0,05$, respectivamente).

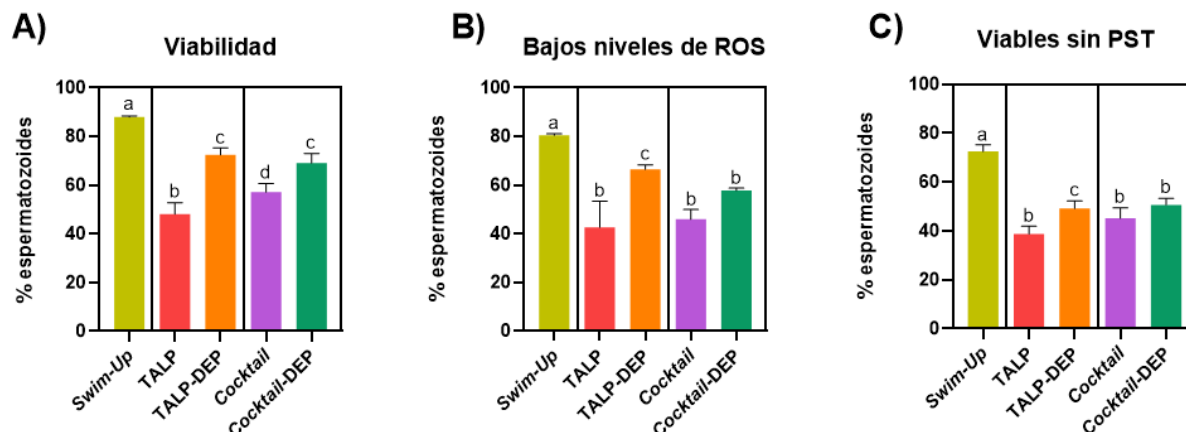


Figura 14. Porcentaje de espermatozoides viables (A), viables con bajos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) (B), y viables sin translocación de fosfatidilserina (PST) (C) en muestras capacitadas en medio TALP y *Cocktail*, suplementadas o no con D-Penicilamina (DEP) en estación no reproductiva (ENR). Los resultados se muestran como media \pm error estándar ($n=4$). Letras distintas (a, b, c, d) indican diferencias significativas.

Por otro lado, en el análisis del **estado de capacitación** (figura 15), el uso de D-Penicilamina en las muestras TALP parece tener un efecto descapacitante, ya que se observaron diferencias significativas en los espermatozoides NC ($P<0,01$), manteniendo valores similares al *Swim-up*. En el caso de muestras *Cocktail*, no se observó ningún efecto.

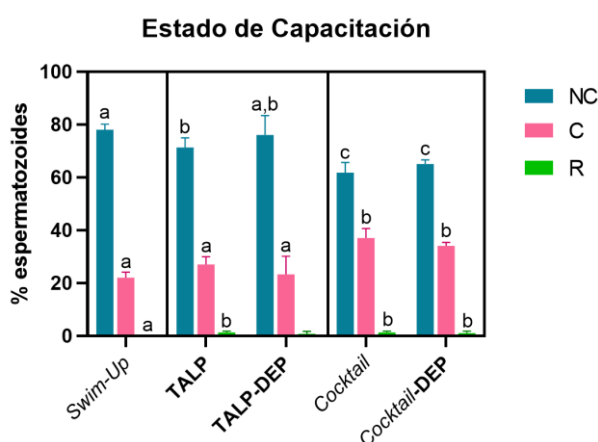


Figura 15. Porcentaje de espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (C) y reaccionados (R) en muestras incubadas en medio TALP y *Cocktail*, suplementadas o no con D-Penicilamina (DEP) en estación no reproductiva (ENR). Los resultados se muestran como media \pm error estándar de la media ($n=4$). Letras distintas indican diferencias significativas entre grupos experimentales.

Igual que en el caso anterior, hay un aumento en los niveles de **proteínas fosforiladas en tirosina** en las muestras capacitadas en medio *Cocktail*, tanto con D-Penicilamina ($P<0,01$) como sin ella ($P<0,05$), con respecto a las capacitadas en el medio TALP con y sin este compuesto (figura 16). Aun así, no hubo diferencias en la cuantificación de fosfotirosinas cuando se compararon los distintos medios con o sin D-Penicilamina en concordancia con el estudio de Leahy y col. (2016).

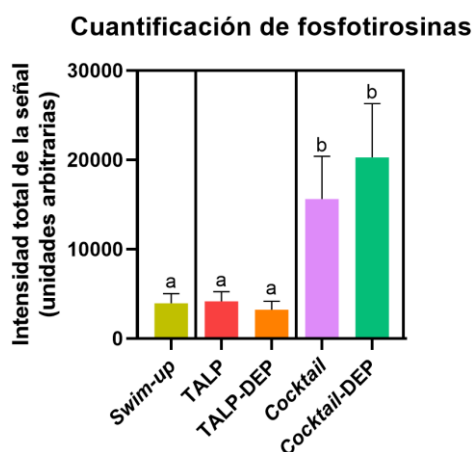


Figura 16. Cuantificación por densitometría de las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina presente en las muestras capacitadas en medio TALP y *Cocktail*, suplementadas o no con D-Penicilamina (DEP) en estación no reproductiva (ENR). Los resultados se muestran como media \pm error estándar de la media ($n=4$). Letras distintas indican diferencias significativas entre grupos experimentales.

Por lo tanto, la adición de D-Penicilamina no parece afectar a la capacitación espermática cuando esta se produce en medio *Cocktail*, como se mostraron los resultados de tinción con CTC y los niveles de fosfotirosinas, sino que este compuesto simplemente evita que se produzca la aglutinación consecuencia de este fenómeno.

6. CONCLUSIONES

- 1) La estacionalidad reproductiva afectó al proceso de selección espermática por *swim-up*/dextrano, siendo de mayor calidad la muestra seleccionada obtenida en la época no reproductiva, ya que presentó una mayor viabilidad y un mayor porcentaje de espermatozoides no capacitados con respecto a la época reproductiva.
- 2) La época del año en la que se obtuvieron las muestras no afectó apenas al proceso de capacitación *in vitro* cuando este se realizó en medio *Cocktail*, ya que sólo se observaron diferencias significativas en los niveles de fosforilación en residuos de tirosina, que estaban aumentados en estación no reproductiva, sin que hubiese diferencias en el resto de los parámetros analizados. Sin embargo, cuando la capacitación se realizó en medio TALP, en estación no reproductiva se observó un mayor porcentaje de espermatozoides no capacitados, y un menor porcentaje de espermatozoides viables con bajos niveles ROS y sin inversión de fosfatidilserina.
- 3) La adición del compuesto anti-aglutinante D-Penicilamina en estación no reproductiva en condiciones capacitantes favoreció la obtención de una muestra de mayor calidad ya que evita la aglutinación cabeza con cabeza, en las muestras capacitadas en medio TALP y *Cocktail*. Además, no pareció influir en el proceso de capacitación espermática cuando este proceso se realiza en medio *Cocktail*.

CONCLUSIONS

- 1) Reproductive seasonality affected the dextran/swim-up sperm selection results by being the selected sample obtained during the non-breeding season of higher quality than the one obtained during the breeding season, as it presented higher viability and a higher percentage of non-capacitated spermatozoa.
- 2) The reproductive season in which the samples were obtained had little effect on the *in vitro* capacitation process when performed in *Cocktail* medium, and significant differences were only obtained tyrosine phosphorylation levels, which were higher in the non-breeding season. There were no differences in the rest of the analysed parameters. However, when capacitation was performed in a TALP medium, a higher percentage of non-capacitated spermatozoa and a lower percentage of viable spermatozoa with low ROS levels and without phosphatidylserine inversion were observed in the non-breeding season.
- 3) The addition of the anti-agglutinating compound D-Penicillamine during non-breeding season and under capacitating conditions prevented head-to-head agglutination and increased sperm quality in samples capacitated in TALP and *Cocktail* medium. Furthermore, it did not seem to influence the sperm capacitation process when carried out in *Cocktail* medium.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kunz G, Beil D, Deininger H, Wudt L, Leyendecker G. The dynamics of rapid sperm transport through the female genital tract: evidence from vaginal sonography of uterine peristalsis and hysterosalpingoscintigraphy. *Human Reproduction*. 1996;11(3):627–32.
2. Saint-Dizier M, Mahé C, Reynaud K, Tsikis G, Mermillod P, Druart X. Sperm interactions with the female reproductive tract: A key for successful fertilization in mammals. *Mol Cell Endocrinol*. 2020 Oct 1;516:110956.
3. Kaeoket K, Persson E, Dalin AM. Influence of pre-ovulatory insemination and early pregnancy on the infiltration by cells of the immune system in the sow endometrium. *Anim Reprod Sci*. 2003 Jan 15;75(1–2):55–71.
4. Pineda MH, Dooley MP, Hembrough FB, Hsu WH. Retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of rams. *Am J Vet Res*. 1987 Apr;48(4):562–8.
5. Gervasi MG, Visconti PE. Molecular changes and signaling events occurring in sperm during epididymal maturation. *Andrology*. 2017 Mar 1;5(2):204.
6. Baldi E, Luconí M, Bonaccorsi L, Krausz C, Forti G. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Frontiers in Bioscience*. 1996 Aug 1;1:189–205.
7. Flesch FM, Brouwers JFHM, Nievelstein PFEM, Verkleij AJ, Van Golde LMG, Colenbrander B, et al. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci*. 2001 Oct 1;114(19):3543–55.
8. Go KJ, Wolf DP. Albumin-Mediated Changes in Sperm Sterol Content During Capacitation. *Biol Reprod*. 1985;32:145–53.
9. Ijiri TW, Hasan AKMM, Sato K ichi. Protein-Tyrosine Kinase Signaling in the Biological Functions Associated with Sperm. *J Signal Transduct*. 2012 Nov 11;2012:1–18.
10. Leyton L, Saling P. 95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell*. 1989 Jun 30;57(7):1123–30.
11. Visconti PE, Galantino-Homer H, Moore GD, Bailey JL, Ning X, Fornes M, et al. The Molecular Basis of Sperm Capacitation. *J Androl*. 1998 Mar 4;19(2):242–8.
12. Yanagimachi R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity How spermatozoa become fertilisation-competent. *Zygote*. 1994;2:371–2.
13. Cánovas S, Coy P. Aspectos moleculares de la fecundación: unión y fusión de gametos. *Revista de Investigación Clínica*. 2008;60:403–13.
14. Berger T, Marrs RP, Moyer DL. Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. *Fertil Steril*. 1985 Feb 1;43(2):268–73.
15. Salazar Cartín J. Introducción a las técnicas de capacitación espermática: un proceso in vitro. *Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica*. 2018 Dec 21;25.
16. Gorus FK, Pipeleers DG. A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. *Fertil Steril*. 1981;35(6):662–5.
17. Harrison RAP. A highly efficient method for washing mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1976;48(2):347–53.

18. Álvarez JG, Lasso JL, Blasco L, Nuñez RC, Heyner S, Caballero PP, et al. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. *Hum Reprod* [Internet]. 1993 [cited 2024 Apr 14];8(7):1087–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7691866/>
19. 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 Jul 1;46(1):141–51.
20. Mortimer D. Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity. *Reprod Fertil Dev* [Internet]. 1994 [cited 2024 Feb 16];6(1):25–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8066218/>
21. Leahy T, Rickard JP, Aitken RJ, De Graaf SP. Penicillamine prevents ram sperm agglutination in media that support capacitation. *Reproduction*. 2016 Feb 1;151(2):167–77.
22. Colas C, James P, Howes L, Jones R, Cebrian-Perez JA, Muiño-Blanco T. Cyclic-AMP initiates protein tyrosine phosphorylation independent of cholesterol efflux during ram sperm capacitation. *Reprod Fertil Dev*. 2008;20(6):649–58.
23. Luna C, Colás C, Casao A, Serrano E, Domingo J, Pérez-Pé R, et al. Ram seminal plasma proteins contribute to sperm capacitation and modulate sperm–zona pellucida interaction. *Theriogenology*. 2015 Mar 1;83(4):670–8.
24. Bromfield EG, Aitken RJ, Gibb Z, Lambourne SR, Nixon B. Capacitation in the presence of methyl- β -cyclodextrin results in enhanced zona pellucida-binding ability of stallion spermatozoa. *Reproduction*. 2014 Feb 1;147(2):153–66.
25. Leahy T, Rickard JP, Aitken RJ, De Graaf SP. D-penicillamine prevents ram sperm agglutination by reducing the disulphide bonds of a copper-binding sperm protein. *Reproduction*. 2016 May 1;151(5):491–500.
26. Rosa HJD, Bryant MJ. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research*. 2003 Jun 1;48(3):155–71.
27. Muñoz C. Reproducción de ovinos: conceptos básicos, manejo y biotecnología [Internet]. Santiago de Chile; 2001 [cited 2024 Apr 10]. Available from: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/8722>
28. Malpaux B, Thiéry JC, Chemineau P, Malpaux Jean-Claude Thiéry B. Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reprod Nutr Dev*. 1999;39(3).
29. Ebling F, Hastings M, Hastings MH. The neural basis of seasonal reproduction. *Annales de zootechnie*. 1992 Nov 15;41:239–46.
30. Karagiannidis A, Varsakeli S, Alexopoulos C, Amarantidis I. Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. *Small Ruminant Research* [Internet]. 2000 Jul [cited 2024 May 26];37(1–2):125–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10818312/>
31. Ortavant R, Bocquier F, Pelletier J, Ravault JP, Thimonier J, Volland-Nail P. Seasonality of Reproduction in Sheep and its Control by Photoperiod. *Aust J Biol Sci*. 1988;41(1):69–86.
32. Colas G. Fertility in the ewe after artificial insemination with fresh and frozen semen at the induced oestrus, and influence of the photoperiod on the semen quality of the ram. *Livest Prod Sci*. 1979 Apr 1;6(2):153–66.

33. Malejane C, Greyling J, Raito M. Seasonal variation in semen quality of Dorper rams using different collection techniques. *S Afr J Anim Sci*. 2014 Apr 15;44(1):26.
34. Mendoza N, Casao A, Domingo J, Quintín F, Laviña A, Fantova E, et al. Influence of Non-conventional Sperm Quality Parameters on Field Fertility in Ovine. *Front Vet Sci*. 2021 May 7;8:650572.
35. Carvajal-Serna M, Miguel-Jiménez S, Pérez-Pe R, Casao A. Testicular Ultrasound Analysis as a Predictive Tool of Ram Sperm Quality. *Biology (Basel)*. 2022 Feb 1;11(2).
36. Ntemka A, Kiossis E, Boscós C, Theodoridis A, Kourousekos G, Tsakmakidis I. Impact of old age and season on Chios ram semen quality. *Small Ruminant Research*. 2019 Sep 1;178:15–7.
37. Ollero M, Muñio-Blanco T, López-Pérez MJ, Cebrián-Pérez JA. Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. *Int J Androl*. 1996;19(5):287–92.
38. Grasa P, Pérez-Pé R, Báguena O, Forcada F, Abecia A, Cebrián-Pérez JA, et al. Ram Sperm Selection by a Dextran/Swim-Up Procedure Increases Fertilization Rates Following Intrauterine Insemination in Superovulated Ewes. *J Androl*. 2004 Nov 12;25(6):982–90.
39. Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod*. 1988;38(5):1171–80.
40. Harrison RAP, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1990;88(1):343–52.
41. Ward CR, Storey BT. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev Biol* [Internet]. 1984 [cited 2024 May 28];104(2):287–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6745485/>
42. Gillan L, Evans AG, Maxwell WMC. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* [Internet]. 1997 [cited 2024 May 28];9(5):481–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9418976/>
43. Grasa P, Cebrián-Pérez JA, Muñio-Blanco T. Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation. *Reproduction*. 2006 Nov 1;132(5):721–32.
44. Ebel F, Vallejos A, Gajardo G, Ulloa O, Clavel E, Rodríguez-Gil JE, et al. Semen quality and freezability analysis during breeding and non-breeding seasons in heavy draft stallions in southern Chile. *Andrologia*. 2020 Dec 1;52(11):e13797.
45. Miguel-Jiménez S, Borao S, Portolés-Bayod V, Casao A, Pérez-Pe R. In vitro approach points to a chemotactic effect of melatonin on ram spermatozoa. *Theriogenology*. 2022;198:36–46.
46. Wrench N, Pinto CRF, Klinefelter GR, Dix DJ, Flowers WL, Farin CE. Effect of season on fresh and cryopreserved stallion semen. *Anim Reprod Sci*. 2010 Jun 1;119(3–4):219–27.
47. Martí E, Pérez-Pé R, Muñio-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. Comparative study of four different sperm washing methods using apoptotic markers in ram spermatozoa. *J Androl*. 2006 Nov;27(6):746–53.
48. Shi Z Da, Zhang YP, Zhai LP, Zhang MH, Dong YL, Yang HJ, et al. Sperm Parameters, ASAs and Apoptosis After Processing by the Double Tube and Swim up Methods. *Am J Mens Health*. 2021;15(2).

49. Kotwicka M, Jendraszak M, Skibinska I, Jedrzejczak P, Pawelczyk L. Decreased motility of human spermatozoa presenting phosphatidylserine membrane translocation-cells selection with the swim-up technique. *Hum Cell*. 2013 Mar 3;26(1):28–34.
50. Stendardi A, Focarelli R, Piomboni P, Palumberi D, Serafini F, Ferramosca A, et al. Evaluation of mitochondrial respiratory efficiency during in vitro capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl*. 2011 Jun 1;34(3):247–55.
51. Bavister BD, Yanagimachi R. The Effects of Sperm Extracts and Energy Sources on the Motility and Acrosome Reaction of Hamster Spermatozoa in vitro. *Biol Reprod*. 1977;16:228–37.
52. Carvajal Serna M, Pe Pérez RM, Casao Gascón A, Cardozo Cerquera JA. Effect of the constant photoperiod and melatonin on the ram seminal characteristics of breeds reared in equatorial areas. 2022;
53. Gimeno-Martos S, González-Arto M, Casao A, Gallego M, Cebrián-Pérez JA, Muñio-Blanco T, et al. Steroid hormone receptors and direct effects of steroid hormones on ram spermatozoa. *Reproduction*. 2017;154(4):469–81.