



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología

~~Efecto de la competición espermática en los
mecanismos~~ que preparan al espermatozoide
para la fecundación

Ester Sansegundo Hernando
Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC)
Tesis Doctoral

Madrid, 2019



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología

Efecto de la competición espermática en los mecanismos que preparan al espermatozoide para la fecundación

Memoria presentada por Ester Sansegundo Hernando

Dirigida por Eduardo Roldan Schuth, Profesor de Investigación en Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC)

Dirigida por Maximiliano Tourmente Rodriguez, Investigador Adjunto en Instituto de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (IIByT-CONICET)

Tutelada por Ángeles Juarranz de la Fuente, Profesor Docente e Investigador en Departamento de Biología (Universidad Autónoma de Madrid)

Museo Nacional de Ciencias Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva

Grupo de Ecología y Biología de la Reproducción





Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología

Efecto de la competición espermática en los mecanismos que preparan al espermatozoide para la fecundación

El doctorando

Ester Sansegundo Hernando

Vº Bº del Co-Director

Vº Bº del Co-Director

Eduardo Roldan Schuth

Maximiliano Tourmente Rodriguez

Vº Bº de la Tutora

Ángeles Juarranz de la Fuente



La investigación desarrollada durante esta Tesis Doctoral ha sido financiada por la Dirección General de Investigación, Desarrollo e Innovación, del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y por el Fondo Social Europeo, a través de los proyectos: CGL 2012-37423 (IP: Javier del Barco Trillo), CGL2011-26341 (IP: Eduardo Roldan Schuth) y CGL2016-80577-P (IP: Eduardo Roldan Schuth) y del contrato predoctoral para la formación de doctores: BES-2013-066115. Las estancias en instituciones internacionales, en la Universidad de Massachusetts (Massachusetts, EEUU) y Universidad de McGill (Montreal, Canadá), han sido financiadas por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (EEBB-I-15-10310 y EEBB-I-2017-12598, respectivamente).

*A mis padres,
por ser los principales promotores de mis sueños, por locos que fueran.*

Índice

Agradecimientos	3
Resumen / Summary.....	7
Resumen.....	9
Summary	11
Introducción	13
Estructura del espermatozoide	15
Capacitación	16
Metabolismo espermático	21
Competición espermática	24
Objetivos	27
Material y Métodos.....	31
Especies utilizadas.....	33
Obtención e incubación de espermatozoides.....	33
Análisis de parámetros espermáticos	35
Análisis estadístico	47
Resultados.....	53
Serie I.....	55
Metabolismo energético durante la capacitación e hiperactivación en espermatozoides de tres especies de ratón (<i>Mus musculus</i> , <i>Mus spretus</i> y <i>Mus spicilegus</i>)	55
Serie II.....	69
Producción y consumo de ATP en espermatozoides no capacitados y capacitados de <i>Mus musculus</i> (B6D2F1). Papel de la glicólisis y fosforilación oxidativa en la generación de energía.....	69
Serie III.....	84
Producción y consumo de ATP en espermatozoides no capacitados y capacitados de <i>Mus spicilegus</i> . Papel de la glicólisis y fosforilación oxidativa en la generación de energía	84
Serie IV	99
Efecto de la viscosidad sobre la producción energética durante la supervivencia y la capacitación de espermatozoides de tres especies de ratón (<i>Mus musculus</i> , <i>Mus spretus</i> y <i>M spicilegus</i>).....	99

Discusión	119
Serie I: Metabolismo energético durante la capacitación e hiperactivación en espermatozoides de tres especies de ratón (<i>Mus musculus</i> , <i>Mus spretus</i> y <i>Mus spicilegus</i>)	121
Series II y III: Producción y consumo de ATP en espermatozoides no capacitados y capacitados de <i>Mus musculus</i> (B6D2F1) y <i>Mus spicilegus</i> . Papel de la glicólisis y fosforilación oxidativa en la generación de energía	124
Serie IV: Efecto de la viscosidad sobre la producción energética durante la supervivencia y la capacitación de espermatozoides de tres especies de ratón (<i>Mus musculus</i> , <i>Mus spretus</i> y <i>Mus spicilegus</i>)	128
Conclusiones	135
Bibliografía	139

Agradecimientos

A poco de terminar la Tesis y sentándome a escribir esta parte, quizás una de las más importantes, solo me viene a la cabeza una frase: “Una victoria puede quedar en los libros, pero la forma de conseguirla es lo que permanece en la memoria de la gente”. A lo largo de estos años mucha gente ha compartido este proceso conmigo, y a los cuales les pertenece parte de esta Tesis. Gracias por compartir cada momento, cada palabra de ánimo, cada sonrisa, cada detalle, cada abrazo... Sin vosotros esto no hubiera sido posible.

En primer lugar agradecer a Eduardo y Maxi, directores de esta Tesis por darme la oportunidad de descubrir este mundo de la investigación y guiarme por el camino que ahora quiero seguir. También quiero agradecer a mi tutora de la UAM, Ángeles por su ayuda con los trámites de la universidad y las sugerencias en esta Tesis. A Pablo Visconti, Christian O'Flaherty y a sus equipos por darme la oportunidad de realizar una estancia en sus laboratorios, en los cuales he aprendido una gran cantidad de cosas.

Durante estos años he tenido la oportunidad de trabajar con gente maravillosa a mi lado. Gracias a Juan Antonio por confiar en mí y darme la oportunidad de empezar una nueva etapa que nunca me había planteado y en este momento creo que ha sido una de las mejores decisiones que he tomado. A Chechu, fuiste una de las primeras personas que conocí en esta etapa y gracias a ti todo fue más fácil, acepte tu legado y espero haber dejado el listón bien alto. María y Lena, gracias por todos vuestros consejos de “doctorandas” mayores. Esperanza, gracias porque sin ti los experimentos no habrían salido adelante. A Dan, que aunque hemos coincidido muy poco, siempre te has preocupado por cómo avanza esta Tesis. A Jerylle, con la que compartí muchas risas en el labo, es lo que tiene los WB. Y por último y no menos importante (quizás, todo lo contrario) Pilar y Nushin, gracias por compartir todos estos años, por todos los ratitos de café y confesiones (que tanto he echado de menos este último año). Ya no solo sois compañeras de laboratorio, si no, sois amigas, y espero que podamos seguir compartiendo momentos juntas fuera de aquí. Pilar, todavía te estamos esperando en Madrid.

De estos años me llevo amigos maravillosos, que espero que sigan formando parte de mi vida. En primer lugar agradecer a mis chicas del museo, con las cuales he compartido confidencias y unas cuantas copas de vino. Raquel, nos conocimos en la universidad, allá por cuarto, y en ese momento nunca pensé que te fueras a convertir en una persona indispensable en mi vida. Gracias por confiar en mí desde el primer momento, por esos cafés infinitos y todas las risas y confidencias tanto dentro como fuera del museo. Eres una persona maravillosa, gracias por salirte conmigo de esa horrible “secta”. Mireia, has sido un gran apoyo durante estos últimos años, gracias por templarme los nervios e impedir que desistiera. Siempre nos quedaran nuestras charlas sobre los achaques de la edad. Irene, poco a poco te has convertido en un gran apoyo y que me has demostrado que siempre estarás cuando te necesito, gracias por sacarme

tantas sonrisas. Te lo mereces todo, la vida te deparara muchas cosas buenas, aunque en estos momentos te cueste verlo. Stef, has sido la última incorporación pero ya formas parte de todo esto, gracias por saber escuchar y por todos tus buenos consejos. Elisa y Eva, vosotras ya no estáis tan cerca físicamente, pero si seguís formando parte de esto, sois dos ejemplos a seguir y una demostración de que los sueños se cumplen. Y por último Chio, en estos momentos existe un gran océano entre nosotras, pero espero que algún día desaparezca. Gracias por compartir conmigo tanto las cosas buenas como las no tan buenas. Te echo mucho de menos. ¡Gracias por todo y a por muchas más risas juntas!

A toda la gente del Museo que me ha acompañado en esta etapa, en especial a mis compis de la 1111. Shirin, Jorge, Irene y Gonzalo. Shirin gracias por “obligarme” a dar un paso al frente y luchar porque esto saliera adelante, aunque no lo creas has sido una parte imprescindible de todo esto. Jorge, gracias por cada una de tus bromas incomprensibles que animan cada día el despacho. Irene, aquí de nuevo... Y Gonzalo, creo que tenemos una gran conexión, hemos tardado en conocernos de verdad, pero creo que no me equivoco diciendo que estarás siempre que te necesite. Gracias por aguantar mis suspiros día tras día. Eres un gran ejemplo a seguir (aunque no te lo creas). Gracias chicos por cada momento tanto dentro de esas cuatro paredes como fuera. Y como olvidarme de Saúl que ha venido a revolucionar el despacho.

A los tupperos, Eva, Iraida, Alicia, Ruth, Dani, Edu, Mario, Ismael, Manu, Fernando, Cris, Ángel, etc. Gracias por dejarme compartir con vosotros todos los sinsabores de esta etapa y por cada uno de vuestros consejos.

A las personas que ya no comparten cada día conmigo, pero han formado parte de esto, Roger, Octavio, Indra, Jaime, Melinda Sergio, Martí, etc. Y en especial a Juan, ¡esto sí que es una relación de amor-odio! Gracias por sacarme una sonrisa cada vez que lo necesito y por dejarme ser la que ocupe tu lugar en la 1111.

Pero no solo la gente del Museo ha estado pendiente de los avances de esta Tesis. Elena, todo empezó el primer día de universidad y espero que no termine. Gracias por dejarme formar parte de tu vida. Eres maravillosa y admirable, ¡de mayor quiero ser como tú! Gracias por apoyarme y confiar en mí, no solo a lo largo de esta etapa, si no desde el momento en el que nos conocimos. Gracias a ti, he podido conocer a dos personas geniales, Elia e Isa. Espero que sigamos compartiendo festivales, camas, risas, churros... En muy poco tiempo os habéis ganado una parte de mí. Quizás os he conocido en una de las “peores” etapas, pero si estáis en estos momentos, no me quiero imaginar cuando las cosas sean una maravilla.

Durante estos últimos meses, Daniel, te has convertido en mi confidente, al cual puedo acudir siempre que necesite desahogarme. Gracias por hacerme olvidar todo este proceso aunque sea por unas pocas horas. Nos vemos en Valencia!

Pero quizás la parte más importante de mi vida, y como no de esta etapa es mi familia. Gracias a ellos al final, todo esto que parecía tan lejano e imposible, se ha hecho

realidad. Gracias papa por cuidarme en silencio hasta este día, que sé que aunque no expreses tus sentimientos, te alegras tanto o más que yo por cada uno de mis logros. A ti mama, que decirte, eres la persona que ha estado a mi lado en cada momento en el cual te he necesitado. Siempre has estado dispuesta a venir a verme cuando un simple catarro me atacaba... Sé que al igual que yo has pasado momentos muy malos con esta Tesis, pero por fin, esto se hace realidad. Ahora llega otra etapa complicada, pero sé que seguirás a mi lado, para apoyarme en cada una de las aventuras que quiera embarcarme. Aunque en ocasiones no nos aguantemos... Sois los mejores! Os amo.

Y mis hermanos, que decir de vosotros! David, tú has estado cada vez que he necesitado un abrazo, sé que siempre cuidarás de mí, como buen hermano mayor que eres. En muchas ocasiones echo tanto de menos nuestras charlas larguísimas de cualquier cosa. Rocío, hemos tenido momentos muy malos, como buenas hermanas, pero siempre hemos sabido superar esos momentos, ahora eres una de mis mejores amigas, con la que sé que siempre podré contar. Gracias por todos esos cotilleos que me dan la vida los fines de semana en casa de los “papas”. Vosotros dos soy dos pilares fundamentales en mi vida, mis dos manos derechas. Siempre podréis contar conmigo, igual que, con toda confianza, lo haré yo con vosotros. Os quiero.

Durante estos años muchas personas han pasado por mi vida, personas que en estos momentos ya no forman parte de ella, pero han marcado gran parte de esta etapa. Gracias, porque sin vosotros esto no hubiera salido adelante, y yo no sería como soy en estos momentos. Sobre todo gracias a ti, sé que no leerás esto, pero has sido un gran apoyo para mí durante gran parte de esta etapa. Espero que todo te vaya genial y que consigas cada uno de retos que te propongas, porque te lo mereces.

Una mención especial a unos cuantos que han parado durante un ratito su vida para que estos últimos días, la Tesis finalmente saliera adelante, especialmente a Elia, por esa gran portada.

Y si me olvido de alguien que me perdone...

Y por último, esta Tesis merece ser dedicada a Ester. Gracias a su gran perseverancia esto ha salido adelante. No han sido años fáciles, pero al final siempre sale el sol (recuérdalo siempre) ¿Cuál será el siguiente reto?

Resumen / Summary

Resumen

La capacitación es un proceso por el cual los espermatozoides adquieren la capacidad de fecundar el/los óvulo/s. Este proceso ocurre en el tracto genital de la hembra, pero puede replicarse *in vitro* incubando los espermatozoides en un medio y condiciones adecuadas. Durante este proceso los espermatozoides experimentan una serie de cambios tanto en la cabeza como a lo largo de todo el flagelo, como por ejemplo, cambios en la arquitectura e hiperpolarización de la membrana plasmática, incremento de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, incremento de pH intracelular o aumento de la fosforilación en tirosina. Un rasgo característico de la capacitación es el cambio en los patrones de motilidad conocido como hiperactivación.

Estudios anteriores indicaron que la motilidad y la velocidad de los espermatozoides están relacionadas con el contenido de ATP intracelular, el cual depende del metabolismo energético tanto en estado de supervivencia (es decir, en condiciones que no promueven la capacitación) como durante la capacitación. Así, la cantidad de ATP depende de un balance entre la producción y el consumo del mismo. Inicialmente se postuló que el proceso de capacitación, junto con la hiperactivación, ocasionaba un mayor consumo del ATP disponible y que, en consecuencia, cabría observar un menor contenido de ATP en el espermatozoide capacitado.

Con el fin de examinar diversos aspectos del metabolismo energético de los espermatozoides, y utilizando como modelo tres especies de ratones (*Mus musculus*, *M. spretus*, *M. spicilegus*) que varían en la competitividad de sus espermatozoides, los objetivos de esta Tesis se centraron en: (a) análisis de niveles de ATP durante el proceso de capacitación, (b) estudio de las vías metabólicas utilizadas por los espermatozoides para generar ATP, (c) efecto de diferencias en la viscosidad sobre la capacitación y el metabolismo energético subyacente.

Los resultados mostraron que los espermatozoides capacitados presentan unos niveles de ATP menores que los espermatozoides incubados en condiciones de supervivencia. El desarrollo de la capacitación se acompañó de un movimiento espermático más vigoroso, de hiperactivación, cuyo patrón fue diferente en las distintas especies.

El metabolismo espermático mostró diferencias tanto entre espermatozoides no capacitados y capacitados como entre especies. La comparación de dos especies que representan los extremos inferior y superior del rango de niveles de competición espermática (*M. musculus*, *M. spicilegus*) permitió identificar una serie de diferencias en el metabolismo energético. Las dos rutas principales por las cuales los espermatozoides consiguen energía en forma de ATP son la fosforilación oxidativa, que ocurre en las mitocondrias situadas en la pieza media del espermatozoide, y la glicólisis, que ocurre a lo largo de todo el flagelo del espermatozoide. La producción de ATP en ambas especies fue menor en los espermatozoides capacitados, mientras que el consumo de ATP fue similar en ambas condiciones. Estos resultados sugieren que el proceso de capacitación no produce un mayor consumo de ATP, sino que los espermatozoides

aumentan la actividad de la glicólisis a expensas de la actividad de la fosforilación oxidativa. Este cambio ocasiona una menor producción de ATP, que se refleja en el contenido de ATP de los espermatozoides.

Cuando los espermatozoides son transferidos al tracto genital de la hembra encuentran un medio viscoelástico que puede ocasionar cambios tanto en la hiperactivación de los espermatozoides como en su metabolismo. La incubación de los espermatozoides en un medio con alta viscosidad mostró un cambio en el patrón de movimiento hiperactivado que favorece el movimiento progresivo de los espermatozoides. El aumento de la viscosidad del medio de incubación se acompañó de un descenso del contenido de ATP en los espermatozoides, tanto en los espermatozoides capacitados como en aquellos incubados en estado de supervivencia.

Se realizó un análisis comparativo entre tres especies del género *Mus*, que presentan diferentes niveles de competición espermática, para valorar si las diferencias en el proceso de capacitación, principalmente a nivel metabólico, pueden explicarse por diversidad en esta fuerza selectiva. Cuando las hembras son poliándricas, los espermatozoides de diferentes machos deben competir para fecundar el/los óvulo/s. Se ha encontrado que la competición espermática es una potente fuerza selectiva que ha modificado la conducta sexual, la producción de espermatozoides, su morfología y función. Poco se sabe sobre el efecto de la competencia espermática en los procesos funcionales relacionados con la fecundación, como es el caso de la capacitación en mamíferos. Los resultados mostraron diferencias entre las especies en relación a su metabolismo energético. Las especies con mayor nivel de competición espermática presentan mayores niveles de contenido de ATP, producción de ATP más eficiente y un mayor consumo de ATP. Estos resultados indican que el proceso de capacitación y sus modificaciones metabólicas están condicionados por la competición espermática.

En conclusión, los resultados de esta Tesis muestran que los espermatozoides capacitados cambian su metabolismo, favoreciendo un metabolismo glicolítico frente a un metabolismo oxidativo, lo que conduce a una menor producción de ATP, y que se traduce en un menor contenido de ATP en el espermatozoide capacitado. Las diferencias encontradas entre las especies estudiadas revelan que la competición espermática es una fuerza evolutiva importante que influye en la capacitación de los espermatozoides y, más concretamente, en el metabolismo espermático.

Summary

Capacitation is a process by which spermatozoa acquire the ability to fertilize the ova. Such process occurs within the female's genital tract, but it can be replicated *in vitro* by incubating sperm in appropriate media and conditions. During this process the sperm undergo a series of changes both in the head and along the flagellum, e.g. changes to its structure, hyperpolarization of the plasma membrane, increase in intracellular Ca^{2+} concentrations; increase in intracellular pH or increase in protein tyrosine phosphorylation. A characteristic feature of capacitation is a change in sperm's motility patterns known as hyperactivation.

Previous studies showed that both the motility and velocity of spermatozoa are related to the intracellular ATP content, which depends on the energy metabolism both during sperm survival (i.e., under conditions that do not promote capacitation) and during capacitation. Therefore, the amount of ATP in the sperm cell depends on the balance between its production and consumption. It has been postulated that capacitation, together with hyperactivation, causes higher consumption of available ATP and that, as a consequence, a lower ATP content would exist in capacitated sperm.

The purpose of this Thesis was to analyze various aspects of sperm energy metabolism using as model a group of three mouse species (*Mus musculus*, *M. spretus*, *M. spicilegus*) that differ in sperm competitiveness. The objectives focused on: (a) the analysis of ATP level during the capacitation, (b) a study of the metabolic pathways used by sperm to generate ATP, and (c) the effect of differences in viscosity on capacitation and energy metabolism.

The results of these studies showed that capacitated sperm exhibit lower ATP levels than sperm incubated under survival conditions. The acquisition of capacitation was accompanied by a more vigorous sperm movement (hyperactivation) whose patterns were different between species.

Sperm metabolism showed differences between both capacitated and non-capacitated sperm, and between species. The comparison between species that represent the lower and upper end of the range of sperm competition levels (*M. musculus*, *M. spicilegus*) allowed for the identification of several differences in energy metabolism. The two main pathways by which sperm acquire energy in the form of ATP are oxidative phosphorylation, that occurs in the mitochondria, located in the sperm midpiece, and glycolysis, which occurs along all the sperm flagellum. ATP production in both species was lower in capacitated sperm while the ATP consumption was similar in both conditions. These results suggest that the capacitation process does not generate a higher ATP consumption, but that spermatozoa increase the glycolytic activity at the expense of oxidative phosphorylation. This change causes a lower ATP production, which is reflected in the sperm's ATP content.

When spermatozoa are transferred to the female genital tract, they encounter a viscoelastic environment that can cause changes both in sperm hyperactivation and in

their metabolism. Sperm incubated in high viscosity media showed a change in the pattern of hyperactivated movement which favours progressive movement of the sperm. The increase of viscosity in the incubation media was accompanied by a decline of sperm ATP content both in sperm cells incubated under non capacitating and capacitating conditions.

A comparative analysis was carried out between the three species of the genus *Mus*, which experience different levels of sperm competition, to assess if differences in the capacitation process, mainly at the metabolic level, can be explained by variations in this selective pressure. In polyandric females, the sperm of several males must compete to fertilize the ova. It has been found that sperm competition is a powerful selective pressure that has modified sexual behaviour of animals, and sperm production, morphology and function. Little is known about the effect of sperm competition in the functional processes related to fertilization, including sperm capacitation. The results of studies presented here showed differences between species in relation to their energy metabolism. The species with higher sperm competition levels showed higher levels of ATP content, a more efficient ATP production, and a higher ATP consumption. These results indicate that capacitation, and underlying metabolic processes, are strongly influenced by sperm competition.

In conclusion, the results from this Thesis demonstrate that capacitated mouse spermatozoa change their metabolism, favouring a glycolytic pathway instead of an oxidative pathway to generate energy, leading to a lower ATP production which translates into a lower ATP content in the capacitated sperm. The differences found between mouse species show that sperm competition is an important evolutionary force influencing sperm capacitation and, more specifically, sperm metabolism.

Introducción

Estructura del espermatozoide

Los espermatozoides son células móviles, cuya función es llegar hasta la ampolla del oviducto y participar en la fecundación. Los espermatozoides son células compartimentalizadas que se componen de dos estructuras principales altamente diferenciadas: la cabeza y el flagelo.

La cabeza está compuesta por el núcleo haploide que contiene la cromatina hipercompactada y el acrosoma, que se sitúa en la parte apical de la cabeza. El acrosoma es un gránulo exocitótico que contiene enzimas líticas que con su liberación durante un proceso de exocitosis (la llamada "reacción acrosómica"), ayuda al espermatozoide a penetrar las células del cúmulo y la zona pelúcida (Fig. 1).

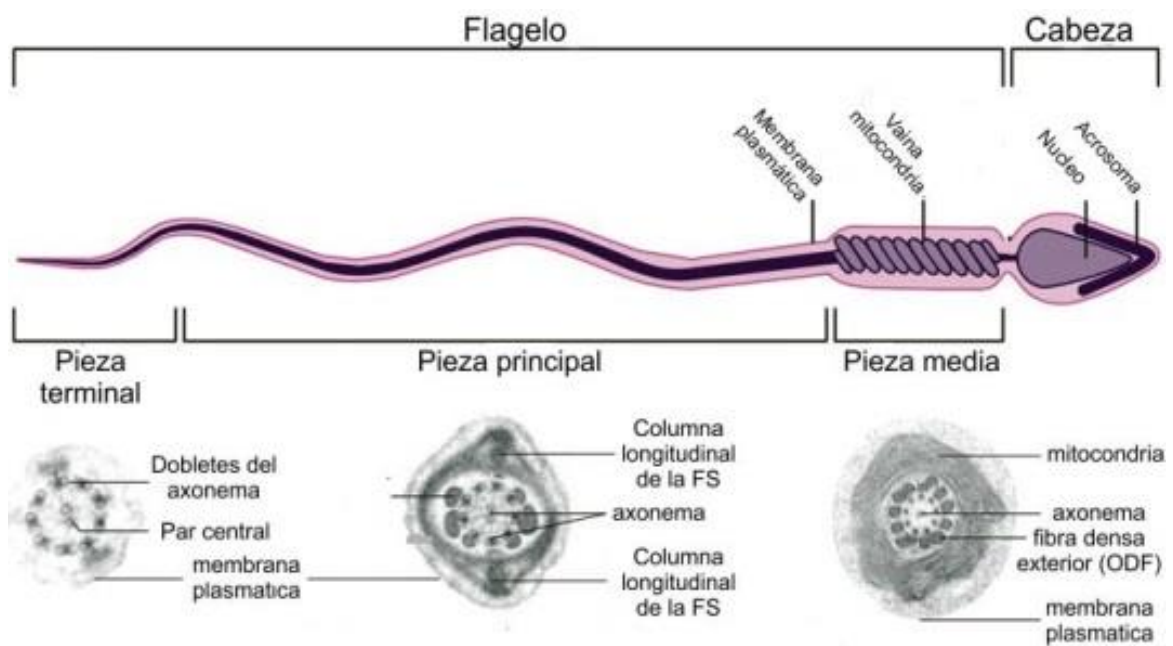


Figura 1. Estructura del espermatozoide de mamífero y sus componentes. Modificado de Borg et al. (2010)

El flagelo es la parte móvil del espermatozoide y está formado por tres estructuras: la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal. El flagelo proporciona a la célula su capacidad de natación a partir de la hidrólisis de ATP por las moléculas de dineína asociadas a los microtúbulos del axonema (Jeulin y Soufir, 1992).

En la pieza intermedia se encuentran las mitocondrias, que producen energía a través de la fosforilación oxidativa. La pieza principal contiene enzimas que producen ATP a través de la glicólisis anaeróbica (Ford, 2006; Ruiz-Pesini et al., 2007; Storey, 2008; Cummins, 2009).

Los espermatozoides deben adaptarse a los distintos ambientes donde tiene lugar la fecundación. En la fecundación externa, normalmente el fluido por el que nadan es

agua, un medio homogéneo y, por tanto, los espermatozoides presentan una morfología simple (Baccetti, 1985). En especies con fecundación interna los espermatozoides han modificado su morfología para poder adaptarse a diferentes ambientes y estructuras del tracto reproductor femenino. Esto ha resultado en una gran diversidad en la morfología de los gametos masculinos (Briskie et al., 1997; Presgraves et al., 1999; Pitnick et al., 2003; Minder et al., 2005; Holman et al., 2008).

Capacitación

Para adquirir la capacidad de fecundar los óvulos, los espermatozoides de mamíferos experimentan una serie de cambios bioquímicos, fisiológicos y en su comportamiento. Estos cambios se producen una vez las células están en el tracto reproductivo femenino y les confieren la capacidad de migrar a través del tracto genital respondiendo a las señales emitidas por el/los óvulos, unirse a la zona pelúcida, realizar la reacción acrosómica, penetrar las células del cúmulo e interactuar con el óvulo (atravesando la zona pelúcida). Se ha denominado "capacitación" (Austin, 1952) al conjunto de procesos que tienen lugar entre la deposición en el tracto genital femenino y la interacción con el óvulo. Este fenómeno se identificó inicialmente en ratas (Austin, 1951) y en conejos (Chang, 1951) al comprobar que los espermatozoides no eran capaces de fecundar de forma inmediata una vez que son colocados en el tracto femenino. El uso del término "capacitación" y el proceso al que se refiere es controvertido y las bases fisiológicas, bioquímicas y moleculares aún no se conocen con precisión. La definición inicial de capacitación ha sido considerada muy amplia por muchos autores y se ha planteado que debe restringirse a la serie de cambios que tienen lugar antes de la reacción acrosómica (Bedford, 1970, Bavister, 1973; Austin et al., 1973; Austin, 1975; Johnson, 1975; Yanagimachi, 1981). Sin embargo, existen argumentos a favor de mantener el sentido original del término y considerar que la capacitación abarca todo el tiempo que el espermatozoide pasa en el tracto femenino, y denominando "primera parte de la capacitación" a los procesos que tienen lugar antes de la reacción acrosómica (Chang, 1984).

Debido a la complejidad que presenta el proceso de capacitación, y el hecho de que tiene lugar en el interior del tracto femenino, se ha recurrido a estudiarlo principalmente en condiciones *in vitro*. Los estudios bioquímicos y moleculares realizados en estas condiciones han permitido avanzar en una caracterización de los mecanismos que subyacen al proceso (revisiones en Visconti, 2009; Gervasi y Visconti, 2016). Para realizar la capacitación *in vitro*, es necesario que el medio de incubación este suplementado con una serie de electrolitos: Na^+ (Zeng et al., 1996; Demarco et al., 2003), K^+ (Fraser, 1983; Munoz-Garay et al., 2001), Cl^- (Jin et al., 2009), HCO_3^- (Lee y Storey, 1986; Shi y Roldan, 1995; Demarco et al., 2003; Gadella y Harrison, 2000; Harrison y Gadella, 2005), Mg^{2+} (Fraser, 1987; Yamazaki et al., 2016) y Ca^{2+} (Yanagimachi y Usai, 1974; Fraser, 1977, 1982; Shams-Borhan y Harrison, 1981; Yanagimachi, 1982; Navarrete et al., 2015), que intervienen en diferentes rutas de señalización celular. Además es necesario un sustrato metabólico, como puede ser la

glucosa, piruvato o lactato, para que los espermatozoides consigan energía en forma de ATP para mantener su integridad celular y una adecuada motilidad, además de realizar otros procesos que consumen energía (Goodson et al., 2012). Por último, se requiere un aceptor de colesterol para facilitar la fluidez de la membrana plasmática, que normalmente es la albúmina bovina (Demarco et al., 2003). Todos estos componentes son básicos para mantener una supervivencia del espermatozoide y activar diferentes rutas de señalización celular que lo habilitan para fecundar el ovulo *in vitro*.

A nivel molecular la capacitación se asocia con: (1) Cambios en la arquitectura de la membrana plasmática (Harrison, 1996; Visconti et al., 1999; Harrison y Miller, 2000, Gadella y Harrison, 2000, 2002). (2) Hiperpolarización de la membrana plasmática (Zeng et al., 1996). (3) Pérdida de colesterol (Zarintash y Cross, 1996; Escoffier et al., 2012) y otras modificaciones lipídicas (Gadella y Harrison, 2000). (4) Incremento de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular (Bailey and Storey, 1994; Arnoult et al., 1999). (5) Incremento del pH (Zeng et al., 1996). (6) Activación de la adenilil ciclasa, que estimula la generación de AMPc (Okamura et al., 1985; Garty et al., 1988; Visconti et al., 1990; Fraser, 2010), el que a su vez activa la proteína kinasa A (Turner, 2006; Fraser, 2010) que, después, activa otras vías de señalización asociadas al proceso de capacitación (Harrison y Miller, 2000; Harrison, 2004). (7) Incremento de la fosforilación en residuos de tirosina (Visconti et al., 1995a; Fraser, 2010; Krapf et al., 2010).

Estos cambios a nivel molecular están vinculados a dos procesos altamente relacionados con la capacitación como son la hiperactivación y la reacción acrosómica:

Hiperactivación:

En la mayoría de las especies, los espermatozoides se mantienen inmóviles en la región caudal de los epidídimos. Una vez que se mezclan con plasma seminal o con un medio equivalente, empiezan a moverse. A este proceso se le denomina "activación" de la motilidad. El movimiento activado se caracteriza por ser un movimiento progresivo, con alta velocidad y simetría, y baja amplitud flagelar, lo que confiere a los espermatozoides una trayectoria casi lineal (Fig. 2A) (Yanagimachi, 1994; Ho y Suarez, 2001; Goodson et al., 2011). Una vez que los espermatozoides experimentan el proceso de capacitación, manifiestan un cambio en el tipo de movimiento, que se ha denominado "hiperactivación". La hiperactivación se caracteriza por ser un movimiento asimétrico, con pérdida de progresividad, con alta amplitud flagelar y mayor vigor (Fig. 2B) (Yanagimachi, 1970; Suarez, 2008; Chang y Suarez, 2011; Goodson et al., 2011). Estas curvas asimétricas producen un movimiento en forma de ocho. Este tipo de movimiento fue descubierto por Yanagimachi (1970).

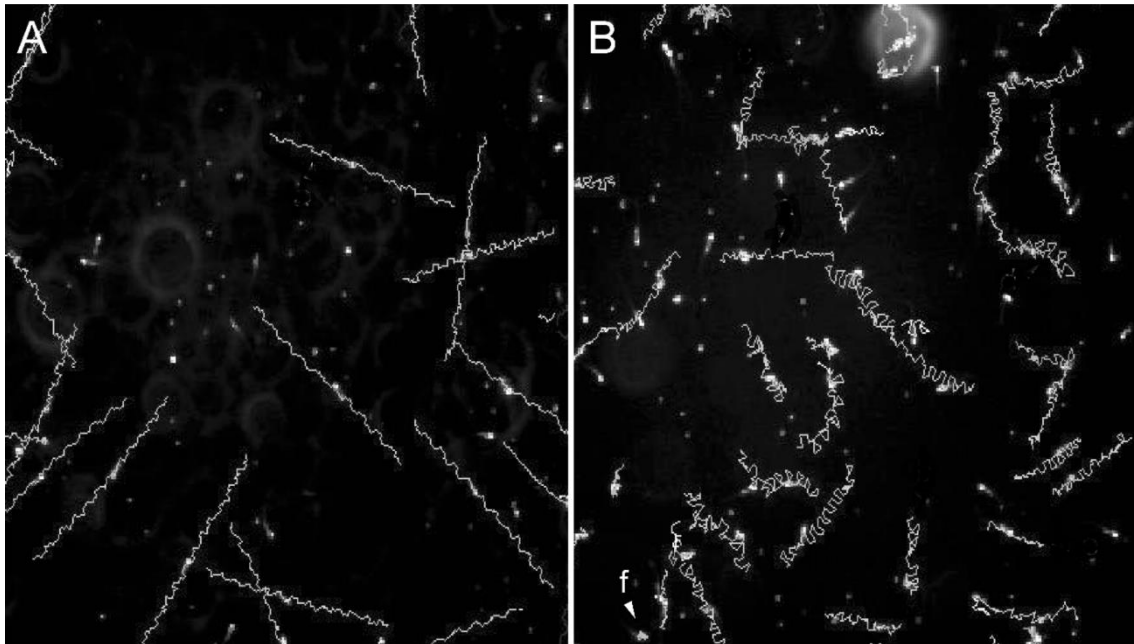


Figura 2. Cambio en los patrones de movimiento de los espermatozoides durante la capacitación *in vitro*. (A) Espermatozoides con un patrón de movimiento activado. (B) Espermatozoides con un patrón de movimiento hiperactivado. Imagen modificada de Goodson et al. (2011).

En el tracto genital de la hembra, los espermatozoides se encuentran con regiones donde la viscosidad varía, llegando a encontrar algunas en las que las secreciones mucosas son muy espesas y presentan una alta resistencia (Jansen, 1978; Smith et al., 2009; Miki y Clapham, 2013). Se han encontrado variaciones en viscosidad a nivel estructural, con diferencias entre el cuello del útero y el istmo oviductal (Jansen, 1978; Smith et al., 2009; Miki y Clapham, 2013), cambios durante el ciclo estral (durante la ovulación de células del oviducto están recubiertas de un fluido viscoso que desaparece horas después de la ovulación (Jansen, 1978)); y justo después del apareamiento, que desaparece unas horas más tarde (Miki y Clapham, 2013). La hiperactivación confiere a los espermatozoides un tipo de movimiento que les ayuda a moverse a través de ese medio viscoso. El movimiento de los espermatozoides hiperactivados es más eficiente, y progresivo en el medio viscoso que el de aquellos que están activados (Suarez et al., 1991; Suarez y Dai, 1992; Miki y Clapham, 2013; Kantsler et al., 2014).

La hiperactivación está estrechamente relacionada con las concentraciones de Ca^{2+} en el espermatozoide: los niveles de Ca^{2+} aumentan durante la hiperactivación en el flagelo del espermatozoide (Ho y Suarez 2001; Xia et al., 2007). Cuando los niveles de Ca^{2+} intracelular no son los adecuados, como es el caso de los espermatozoides de ratones mutantes para CatSper, las células espermáticas no son capaces de hiperactivarse y por tanto no son capaces de moverse a través de un medio viscoelástico *in vitro* (Quill et al., 2003). Otros estudios en los que se inhibe el flujo normal del Ca^{2+} dentro de la célula espermática, han mostrado una reducción en el porcentaje de hiperactivados en un 75% (Ignatz y Suarez, 2005; Schlingmann et al., 2007).

Reacción acrosómica

La reacción acrosómica es un proceso que culmina con la fusión de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática, dejando expuesta la membrana acrosomal interna (Gwatkin, 1976, 1977; Yanagimachi, 1978; Vigil et al., 2007). Con la reacción acrosómica se produce la liberación de las enzimas hidrolíticas que ayudan al paso de los espermatozoides a través de la zona pelúcida. Únicamente los espermatozoides que han experimentado la reacción acrosómica son capaces de interactuar y penetrar la zona pelúcida y, después fusionarse con la membrana plasmática del óvulo (Vacquier and Moy, 1977; Nolan y Hammerstedt, 1997; Jungnickel et al., 2001; Vigil et al., 2007).

Existen diferentes factores fisiológicos y no fisiológicos que desencadenan la reacción acrosómica, pero dos de ellos son esenciales *in vivo* para que la reacción acrosómica ocurra: una glucoproteína de la zona pelúcida (deLamirande et al., 1997; O'Toole et al., 2000; Jungnickel et al., 2001; Harper et al., 2006) y la progesterona (Roldan et al., 1994; Murase y Roldan, 1996; Vigil et al., 2007). Diferentes estudios establecieron que la glucoproteína de la zona pelúcida, era el factor principal para que se produzca la reacción acrosómica (Florman y Storey, 1982; Bleil y Wassarman, 1983; Uto et al., 1988; Buffone et al., 2009), pero en la actualidad diferentes estudios han establecido que la reacción acrosómica se inicia antes de que el espermatozoide entre en contacto con la zona pelúcida (Jin et al., 2011; Hino et al., 2016; La Spina et al., 2016). En la actualidad no se sabe cuál puede ser el primer estimulante para que ocurra la reacción acrosómica, pero un gran candidato puede ser la progesterona, que es secretada por las células del cúmulo, pudiendo llegar por difusión a todo el tracto genital de la hembra (Jin et al., 2011), y podría inducir una sensibilización previa del espermatozoide para la posterior acción de la zona pelúcida (Roldan et al., 1994).

La hiperactivación y la reacción acrosómica son dos procesos que, según la definición original del término, están englobados dentro de la capacitación (Chang, 1984), ya que son esenciales para la fecundación del ovulo por parte del espermatozoide. En relación con la hiperactivación, diferentes estudios indican que la capacitación y la hiperactivación son dos procesos independientes ya que se ha observado *in vitro* que en espermatozoides de ratones que presentan el haplotipo "t" se hiperactivan de manera prematura, mientras que la capacitación tiene lugar en el tiempo conocido para la especie (Olds-Clarke, 1989). Además, se ha observado que en un medio con bajo contenido en bicarbonato, el proceso de capacitación tiene lugar, mientras que la hiperactivación no llega a completarse (Boatman y Robbins, 1991; Stauss et al., 1995). Aun así, no se ha demostrado de manera concluyente que sean procesos independientes (Suarez, 1996; Baker et al., 2006).

En relación con la reacción acrosómica, está consensuado que éste es un proceso dependiente de la capacitación. Diferentes estudios han determinado que la reacción acrosómica ocurre una vez que los espermatozoides están capacitados ya que son capaces de responder a estímulos de la hembra, como es el caso de la progesterona.

Sabeur y Meizel (1995) indujeron la reacción acrosómica con progesterona en espermatozoides humanos, en un medio con bajo contenido en bicarbonato, necesario para la capacitación, pero los resultados mostraron que los espermatozoides con reacción acrosómica fueron un 60% menos que en espermatozoides incubados con alto contenido de bicarbonato en el medio. Sin embargo, estudios en ratones (Shi y Roldan, 1995) mostraron que los espermatozoides responden a la progesterona en ausencia de bicarbonato, y con una tasa de respuesta similar a las observadas en presencia del catión. Además, la reacción acrosómica está relacionada con un cambio en la fluidez de la membrana que ocurre a causa de la capacitación, permitiendo la entrada de Ca^{2+} (Bleil y Wassarman, 1983; Roldan et al., 1994).

Al margen de que estos tres procesos sean o no independientes, los tres son completamente necesarios para que los espermatozoides lleguen al óvulo, penetren las células del cúmulo y la zona pelúcida, y finalmente fecunden el óvulo (Yanagimachi, 1970; Vacquier y Moy, 1977; Roldan et al., 1994; Nolan y Hammerstedt, 1997; Si y Olds-Clarke, 2000; Jungnickel et al., 2001; Vigil et al., 2007; Matzuk y Lamb, 2008).

El conjunto de estos tres procesos confiere al espermatozoide la capacidad de responder a señales presentes en el tracto femenino que le ayudan a llevar al sitio de la fecundación.

Hasta el presente se ha propuesto tres clases de gradientes por las cuales los espermatozoides son capaces de orientarse a fin de alcanzar los óvulos: (1) Gradiente de temperatura (termotaxis). Diferentes estudios han demostrado que los espermatozoides capacitados pueden detectar pequeñas diferencias de temperatura, poniendo en evidencia así que son termotácticamente receptivos (Bahat et al., 2003; 2012; Boryshpolets et al., 2015). (2) Gradientes químicos (quimiotaxis). Los espermatozoides se sienten atraídos por moléculas con diversa naturaleza química (péptidos, odorantes y esteroides) (Giojalas et al., 2015). La concentración del atrayente a lo largo del tracto genital de la hembra es importante ya que determinan la direccionalidad del espermatozoide a través de este (Chang et al., 2013). Los espermatozoides capacitados (Cohen-Dayag et al., 1995; Oliveira et al., 1999; Fabro et al., 2002; Giojalas et al., 2004) y con el acrosoma intacto (Guidobaldi et al., 2017) pueden responder a este gradiente quimiotáctico y, gracias a la hiperactivación, con su batido flagelar asimétrico, reorientarse y dirigirse hacia la fuente del atrayente (Oliveira et al., 1999; Spehr et al., 2004; Gakamsky et al., 2009; Blengini et al., 2011). (3) Flujo del fluido del tracto genital (reotaxis). Cuando los espermatozoides se encuentran con un flujo de corriente son capaces de responder a este, nadando a contracorriente del mismo (Miki y Clapham, 2013).

Metabolismo espermático

Los espermatozoides de mamífero producen energía en forma de ATP a través de dos rutas metabólicas principales: la fosforilación oxidativa (OXPHOS) y la glicólisis. Ambas rutas metabólicas se localizan en distintos compartimentos de la célula espermática. La OXPHOS ocurre en las mitocondrias, que se encuentran únicamente en la pieza media de la célula espermática, mientras que la glicólisis tiene lugar en la pieza principal del flagelo, donde se encuentran las enzimas glicolíticas asociadas a la vaina fibrosa (Ford, 2006; Ruiz-Pesini et al., 2007; Storey, 2008; Cummins, 2009). A partir de la glicólisis, los azúcares glicolizables (en especial glucosa y fructosa) se metabolizan en piruvato y/o lactato en condiciones anaeróbicas. La OXPHOS tiene una mayor diversificación de sustratos primarios incluido el piruvato, lactato, aminoácidos (Schönfeld y Wojtszak, 2008) o ácidos grasos (Partridge and Leese, 1996), pero necesita condiciones aeróbicas para completar la ruta.

Los espermatozoides son células altamente versátiles en la utilización de diferentes sustratos metabólicos ya que la composición del entorno donde se produce la fecundación puede variar (Ruiz-Pesini et al., 2007; Storey, 2008), siendo además el uso de una u otra ruta metabólica altamente especie-específico. La glucosa, el piruvato y el lactato normalmente están presentes en alta concentración en el tracto genital de la hembra (Gardner y Leese, 1990). De la oxidación de la glucosa se obtiene piruvato que, en condiciones anaerobias, pasa a ser lactato, gracias a la lactato deshidrogenasa (LDH), que ayuda a recuperar en NAD^+ , y es esencial tanto para la glicólisis como para la OXPHOS (Everse y Kaplan, 1973; Odet et al., 2008; 2013). La acumulación de lactato citosólico puede ocasionar una disminución de pH en la célula (Panneerdoss et al., 2012). En condiciones aeróbicas, tanto el piruvato como el lactato pueden entrar en la mitocondria, el piruvato libremente y el lactato convertido en piruvato a través de la LDH, que también se encuentra en la membrana mitocondrial (Passarella et al., 2008), manteniendo un equilibrio entre estos dos compuestos en el citosol (Burgos et al., 1995).

Ya que la OXPHOS produce más ATP por mol de glucosa que la glicólisis (Ruiz-Pesini et al., 1998; 2000; Nakada et al., 2006) (Fig. 3), históricamente se ha considerado como la ruta principal para la producción de ATP en los espermatozoides, relegando a la glicólisis a un segundo plano. Pero en la actualidad se sabe que existe diversidad entre especies en relación al uso predominante de las rutas metabólicas. Existen especies con altas tasas de respiración que no son capaces de mantener la motilidad únicamente con la glicólisis (cerdo y caballo), especies con altos niveles de OXPHOS y de glicólisis (toro, cobaya) y otras especies donde la ruta principal de producción de ATP es la glicólisis (humano y otros primates) (Cummins, 2009).

En el caso del ratón, ambas rutas metabólicas, OXPHOS y glicólisis, son necesarias para mantener una motilidad vigorosa, (Travis et al., 2001; Narisawa et al., 2002; Goodson et al., 2012; Odet et al., 2013; Takei et al., 2014), pero diferentes estudios han determinado que la glicólisis es necesaria para que ocurra la fecundación (Hoppe, 1976;

Fraser and Quinn, 1981; Cooper et al., 1984; Urner et al., 2001; Travis et al., 2001, 2004; Goodson et al., 2012; Odet et al., 2013; Tang et al., 2013). Diferentes alteraciones en enzimas glicolíticas como, la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa 3 (GAPDH) que cataliza un paso intermedio altamente energético y libera equivalentes de reducción ($\text{NADH} + \text{H}^+$) (Danshina et al., 2010), la fosfoglicerato kinasa 2 (PGK2) que produce la primera reacción que produce ATP (Miki et al., 2004) y la lactato deshidrogenasa C (LDHC) que reduce el piruvato a lactato (Odet et al., 2008; 2011; 2013), ocasionan disrupciones en el metabolismo relacionados con la capacitación y la hiperactivación de los espermatozoides, lo que en la mayoría de los casos deriva en infertilidad (Miki et al., 2004; Danshina et al., 2010). Además existen evidencias que muestran que, en presencia de inhibidores de la glicólisis, la motilidad disminuye y las células se tornan inmóviles (Nakada et al., 2006; Ferramosca et al., 2012; Odet et al., 2013). Diferentes estudios han determinado que la presencia de glucosa, o un sustrato glicolisable en el medio, es esencial para que se desarrolle la capacitación y todos los procesos asociados a ella, incluida la fecundación (Hoppe, 1976; Fraser y Quinn, 1981; Urner y Sakkas, 1996; Mukai y Okuno, 2004; Travis et al., 2004). La obtención de ATP por medio de la OXPHOS está altamente relacionada tanto con la motilidad de los espermatozoides como con su calidad, diferenciación y maduración (Ruiz-Pesini et al., 1998; Ford, 2006; Nakada et al., 2006). Los machos de ratón que presentan alteraciones en DNA mitocondrial muestran defectos en la respiración mitocondrial y en ocasiones presentan enfermedades mitocondriales. Esto se asocia a cuadros de infertilidad por deficiencia en la motilidad espermática (Nakada et al., 2006). Sin embargo, es poco probable que el ATP pueda distribuirse a través de todo el flagelo por difusión para poder mantener de manera eficiente la motilidad sin ayuda de la glicólisis (Nevo y Rikmenspoel, 1970; Takao y Kamimura, 2008).

Uno de los problemas que presentan las células espermáticas en relación con la obtención y distribución de energía, es su alta compartimentalización (Travis et al., 2001; Miki, 2007; Storey, 2008; Cummins, 2009). Se sabe que la vía metabólica por la cual los espermatozoides consiguen mayor cantidad de energía por mol de glucosa es la fosforilación oxidativa, pero no está claro cómo se distribuye este ATP a través de todo el flagelo. Para que exista un correcto funcionamiento del espermatozoide, los niveles de energía deben ser los adecuados en cada una de las regiones de la célula. Además, la liberación de energía por parte del ATP, convirtiéndose en $\text{ADP} + \text{P}_i$, requiere que el equilibrio de la reacción esté desplazado, presentando un ratio de 10000 de ATP frente a 1 de ADP. En diferentes especies marinas, como los erizos de mar, se ha descubierto que los espermatozoides poseen un transportador de fosforilcreatina, capaces de mover el fosfato a través del flagelo, desde la pieza media, aportando de esta manera energía a todo el espermatozoide de manera eficiente (Tombes y Shapiro, 1985). En un principio, se pensó que este mecanismo también estaba presente en los espermatozoides de mamíferos, pero se descubrió que la mayoría de ellos carecen de él o está poco desarrollado (Kaldis et al., 1996). La otra hipótesis, que en la actualidad tiene más fuerza es que, al estar presente diferentes enzimas glicolíticas a lo largo de toda la vaina fibrosa del flagelo, la glicólisis produce ATP de manera localizada, dotando a toda la

longitud del flagelo de la capacidad de responder de manera eficiente a la demanda energética de la motilidad (Westhoff y Kamp, 1997; Bunch et al., 1998; Travis et al., 1998, 2001).

Para mantener tanto la homeostasis celular, como los procesos asociados a la capacitación, debe existir un equilibrio entre la producción y el consumo de ATP. La relación entre producción y consumo determina el nivel de reservas energéticas del espermatozoide y su capacidad para mantener su propia integridad celular y la motilidad. Estudios previos han determinado que especies con alto contenido de ATP presentan una mayor motilidad en condiciones no capacitantes (de supervivencia) (Tourmente et al., 2015a; 2018). Todo parece indicar que un mayor contenido de ATP intracelular es consecuencia de una mayor producción de ATP, pero esto puede no ser así, ya que en esta relación se encuentra también implicado el consumo de esta molécula. De este modo, un mayor contenido de ATP puede significar: (a) una mayor producción a igual consumo o (b) igual producción de ATP, pero un menor consumo.

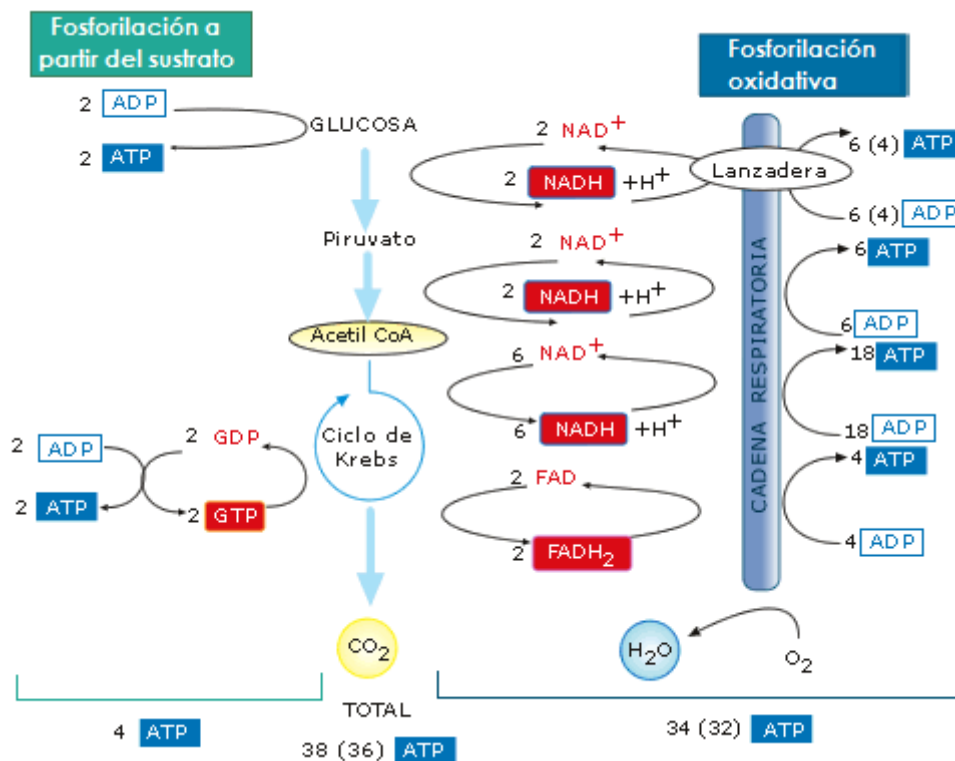


Figura 3. Esquema de la glicólisis y la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Balance energético que obtiene cada una de las vías mencionadas.

Competición espermática

Darwin (1871) enunció el concepto de selección sexual para explicar la existencia de caracteres sexuales secundarios que no responden a la selección natural. Se define este concepto como un proceso que influye sobre ciertos rasgos que no confieren al animal ninguna ventaja de supervivencia, pero si les ayuda competir con individuos de su misma especie con el fin de conseguir mejores oportunidades reproductivas.

En su concepción tradicional, este tipo de selección finalizaría una vez que se ha producido la cópula, limitando la elección de la hembra a la decisión de con qué macho se aparee. Cuando se demostró que las hembras pueden aparearse con varios machos en un mismo ciclo reproductivo (poliandria), se propuso que la competición entre machos puede continuar después de la cópula; a este proceso se le denominó "competición espermática" (Parker, 1970). En especies de fecundación interna, este proceso involucra la competición entre los espermatozoides de varios machos en el tracto genital de la hembra por fecundar el/los óvulo/s. Se considera que esta potente fuerza evolutiva puede influir en la evolución del comportamiento reproductivo y en aspectos de estructura y función de los organismos y sus gametos. Así, esta fuerza evolutiva puede influir tanto en rasgos anatómicos reproductivos como en rasgos propios de los espermatozoides. Uno de los rasgos anatómicos más modificados por la selección sexual postcopulatoria es el tamaño de los testículos. Las especies que presentan una mayor competencia espermática poseen un mayor tamaño testicular en relación a su tamaño corporal. Esta tendencia se ha observado en diferentes taxones como son los insectos (Gage, 1994), peces (Stockley et al., 1997), anfibios (Jennions y Passmore, 1993), aves (Briskie y Montgomerie, 1992) y mamíferos (Gomendio et al., 1998), por lo que se utiliza como indicador de los niveles de competición espermática.

Los rasgos más relevantes que han sido condicionados por la competición espermática son: (1) Aumento del número de espermatozoides en cada eyaculado. Al aumentar el número de espermatozoides de un determinado macho en el tracto genital de la hembra, existe un incremento en la probabilidad de fecundación de ese macho (Parker, 1970; Birkhead y Moller, 1998; Parker y Pizarri, 2010). (2) Aumento de la viabilidad de los espermatozoides. La viabilidad es de gran importancia para el éxito reproductivo (Gomendio et al., 1998; Scott, 2000). (3) Aumento de los espermatozoides móviles. Las especies que suelen presentar un nivel mayor de competición espermática, suelen presentar un porcentaje de células móviles mayor (Gomez-Montoto et al., 2011). (4) Aumento de la velocidad de los espermatozoides. Diferentes estudios han demostrado que un aumento en la velocidad de natación, proporciona al espermatozoide un mayor éxito de reproducción (Birkhead et al., 1999; Gage et al., 2004; Gomendio y Roldan, 2008; Gasparini et al., 2010; Malo et al., 2005). (5) Cambios moleculares (Lüke et al., 2014; 2015). (6) Diferencias a nivel metabólico. Los espermatozoides que presentan mayores niveles de competición espermática, suelen presentar un tipo de metabolismo más oxidativo y altas concentraciones de ATP intracelular (Tourmente et al., 2015a, b). (7) Tamaño y morfología del espermatozoide. El tamaño y la forma del espermatozoide

está altamente relacionada con la velocidad de los espermatozoides (Tourmente et al., 2011; Varea-Sánchez et al., 2016), debido a que los espermatozoides más hidrodinámicos y por tanto más rápidos, verán aumentada su probabilidad de llegar antes al sitio de fecundación.

Estudios previos han examinado el metabolismo espermático de diferentes especies de ratón filogenéticamente cercanas, en condiciones de supervivencia (Tourmente et al., 2015a; 2018), pero existe muy poca información sobre los cambios que se producen en el metabolismo energético como resultado de los procesos de capacitación. Además tampoco se conoce cómo varía entre especies filogenéticamente cercanas que han estado sometidas a diferentes presiones selectivas por competición espermática. Hasta la actualidad, los estudios previos en especies de ratón han mostrado las diferencias en forma y tamaño de los espermatozoides (Gomez-Montoto et al., 2011), en la velocidad de natación y como a su vez está relacionada con el tamaño celular (Tourmente et al., 2011). Se han observado las diferencias en el metabolismo espermático en estado de supervivencia, en especies con diferentes niveles de competición espermática (Tourmente et al., 2015a, 2018). En relación con la capacitación, se han observado diferencias en la cinética de la capacitación y en la proporción de células espermáticas que llegan a capacitarse, según los niveles de competición espermática (Gomendio et al., 2006). El modelo experimental basado en tres especies de ratones (género *Mus*) que difieren en niveles de competición espermática y que, según se ha observado con anterioridad, difieren en una serie de parámetros celulares, incluida la cinética espermática, puede permitir abordar la caracterización de los patrones de metabolismo energético de los espermatozoides en diferentes condiciones fisiológicas. Además, la natación en el tracto genital femenino supone un movimiento en condiciones físicas de mayor viscosidad que los medios de cultivo empleados habitualmente, lo que puede incidir en la producción y el consumo de energía.

Por estos motivos, la presente Tesis doctoral se ha centrado en: (a) realizar un análisis de niveles de ATP intracelular durante el proceso de capacitación, (b) desarrollar un estudio de las vías metabólicas utilizadas por los espermatozoides para generar ATP, (c) examinar el efecto de la viscosidad sobre la capacitación y el metabolismo subyacente.

Objetivos

El objetivo general de la Tesis doctoral ha consistido en el estudio de cómo la capacitación de los espermatozoides, incluyendo la hiperactivación, puede influir en el metabolismo de las células espermáticas. Para ello se han utilizado tres especies de ratón del género *Mus* con diferentes niveles de competición espermática. Se han seleccionado estas tres especies ya que a pesar que están filogenéticamente cercanas, presentan diferencias metabólicas en condiciones basales.

Los objetivos específicos han sido:

1. Caracterizar el patrón de movimiento hiperactivado en los espermatozoides de tres especies de ratón (*Mus musculus*, *Mus spretus* y *Mus spicilegus*) con diferentes niveles de competición espermática y evaluar las posibles diferencias entre ellas.
2. Cuantificar los niveles de ATP de los espermatozoides en estado de supervivencia y en estado capacitado en las tres especies.
3. Evaluar la importancia relativa de la fosforilación oxidativa y la glicólisis como vías de producción de ATP en espermatozoides en estado de supervivencia y en estado capacitado, y examinar la posible respuesta a inhibidores de ambas rutas metabólicas, cuantificando así la respuesta metabólica de las especies (*Mus musculus* B6D2F1 y *Mus spicilegus*) que presentan diferentes niveles de competición espermática.
4. Cuantificar la producción de ATP a través de las dos rutas metabólicas principales: fosforilación oxidativa y glicólisis en espermatozoides en estado de supervivencia y en estado capacitado, estudiando la posible respuesta a inhibidores de ambas rutas metabólicas para conocer la respuesta metabólica de dos especies (*Mus musculus* B6D2F1 y *Mus spicilegus*) que difieren en niveles de competición espermática.
5. Analizar el consumo de ATP, mediante manipulaciones de su producción, en espermatozoides no capacitados y capacitados en dos especies (*Mus musculus* B6D2F1 y *Mus spicilegus*).
6. Realizar un análisis comparativo a nivel metabólico entre dos especies (*Mus musculus* B6D2F1 y *Mus spicilegus*) que presentan diferentes niveles de competición espermática, y determinar si la producción y el consumo presentan diferencias entre ellas para aclarar si la competición espermática actúa como fuerza evolutiva en el metabolismo espermático durante la capacitación.
7. Caracterizar el efecto de factores físicos (viscosidad) sobre el patrón de natación y el metabolismo de los espermatozoides no capacitados y capacitados en tres

especies de ratones con diferentes niveles de competición espermática (*Mus musculus*, *Mus spretus* y *Mus spicilegus*).

Para poder responder tanto al objetivo general de esta tesis, como a los objetivos específicos, se han presentado los Resultados en 4 series. En los cuales en cada uno de ellos se tratan uno o varios objetivos antes mencionados:

- Serie I: Metabolismo energético durante la capacitación e hiperactivación en espermatozoides de tres especies de ratón (*M. musculus*, *M. spretus*, *M. spicilegus*).
- Serie II: Producción y consumo de ATP en espermatozoides no capacitados y capacitados de *M. musculus* (B6D2F1). Papel de la glicólisis y fosforilación oxidativa en la generación de energía.
- Serie III: Producción y consumo de ATP en espermatozoides no capacitados y capacitados de *M. spicilegus*. Papel de la glicólisis y fosforilación oxidativa en la generación de energía.
- Serie IV: Efecto de la viscosidad sobre la producción energética durante la supervivencia y la capacitación de espermatozoides de tres especies de ratón (*M. musculus*, *M. spretus*, *M. spicilegus*).

Material y Métodos

Especies utilizadas

Se emplearon tres especies de roedores pertenecientes a la familia Muridae: *Mus musculus*, *Mus spretus* y *Mus spicilegus*. Estas tres especies fueron escogidas porque representan un grupo monofilético con una divergencia aproximada de 1,7 millones de años (Cazaux et al 2013; Suzuki et al 2013). Además, varios estudios han revelado diferencias a nivel de competición espermática que probablemente han resultado en diversidad en una serie de parámetros reproductivos masculinos tales como el número de espermatozoides (Gomendio et al., 2006; Gomez-Montoto et al., 2011a), el porcentaje de espermatozoides móviles (Gomez-Montoto et al., 2011b; Tourmente et al., 2013, 2015b), los patrones de natación espermática (Tourmente et al., 2013, 2015a, b, 2018), el metabolismo energético de los espermatozoides (Tourmente et al., 2015a, 2018) y en la morfología espermática (Varea-Sanchez et al., 2014). Estas diferencias hacen que estas especies sean adecuadas para estudios comparativos y evolutivos de fisiología de la célula espermática.

De la especie *Mus musculus* se utilizaron dos variantes, individuos provenientes de una colonia derivada de poblaciones salvajes criada en cautividad durante pocas generaciones (MPB) y una cepa de laboratorio, el híbrido B6D2F1 resultante de la cruce de las cepas endocriadas C57Bl/6 (hembras) y DBA/2 (machos). Los individuos de las otras dos especies fueron obtenidos de colonias derivadas de poblaciones salvajes y criadas en cautividad durante pocas generaciones: SEB para *Mus spretus* y ZRU para *Mus spicilegus*. Las tres cepas silvestres fueron suministradas por el Institut des Sciences de l'Évolution, CNRS-Université Montpellier (Francia). El híbrido B6D2F1 fue suministrado por ENVIGO (Barcelona, España).

Los individuos de todas las especies fueron alojados en cajas individuales y mantenidos en animalario en condiciones estándar, con un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad a una temperatura constante de 22 a 24 °C, con alimento y agua *ad libitum*.

El cuidado y manipulación de los animales se hicieron de acuerdo con la normativa vigente, según el Real Decreto de Protección de Animales de Experimentación RD53/2013, conforme a Regulación de la Unión Europea 2010/63. Los procedimientos y las investigaciones fueron aprobados por el Comité de Ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Obtención e incubación de espermatozoides

Los machos fueron sacrificados por dislocación cervical. Seguidamente fueron pesados en una balanza de precisión y medidos con un calibre para obtener la longitud cabeza-tronco y la longitud cabeza-cola. A continuación se procedió a la disección realizando una incisión en la línea media ventral dejando expuesto el aparato reproductor.

Se extrajeron los testículos, se pesaron en una balanza de precisión y se midieron los diámetros mayor y menor con un calibre digital. Uno de ellos se conservó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el otro se fijó en Bouin durante 24 horas y posteriormente se conservó en alcohol. Ambas colas de los epidídimos fueron extraídas y se colocaron en una placa de Petri con 1-2 ml de medio Tyrode modificado (mT-H), precalentado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se realizaron pequeñas incisiones en las colas de los epidídimos para que los espermatozoides pudieran nadar hacia el medio.

Los medios de incubación que se usaron en los experimentos que se describen en esta Tesis estuvieron basados en el medio de Tyrode modificado (Fraser, 1983; Shi y Roldan, 1995). Se empleó un medio de supervivencia (mT-H), compuesto por: 131,89 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 0,49 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,36 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5,56 mM glucosa, 20 mM Hepes, 0,02 mM rojo fenol, 0,09 mM Kanacimina, 20 mM lactato, 0,5 mM piruvato y 4 mg/ml de albúmina bovina libre de ácidos grasos. Se empleó otro medio, un medio de capacitación (mT-BH) que difiere del mT-H en la concentración de NaCl (116,89 mM) y la adición de 15 mM NaHCO_3 . Ambos medios presentaban una osmolaridad aproximada de 295 mOsm/kg y un pH de 7,4. El medio mT-H se emplea en una atmósfera de aire mientras que el mT-BH se emplea en una atmósfera de 5 % CO_2 /aire (Fraser, 1983; Shi y Roldan, 1995). Estos medios variaron en alguno de los estudios realizados.

En los estudios correspondientes a la Serie IV, los espermatozoides se obtuvieron en medio mT-H y se ajustó la concentración a 40×10^6 espermatozoides ml^{-1} . La suspensión espermática se repartió en 4 tratamientos, cada uno de los cuales consistía en un medio de incubación diferente. Para simular la viscosidad del tracto genital de la hembra se utilizó un medio con 2% de polivinilpirrolidona (PVP) (PM: 360,000). El porcentaje utilizado de PVP se eligió a partir de estudios previos en los cuales se evaluó la natación espermática. Los espermatozoides en un medio con un 2% de PVP cambiaban su tipo de natación, pero el porcentaje de motilidad se mantuvo constante a lo largo del tiempo de incubación. Los cuatro tratamientos utilizados fueron: dos tratamientos en el medio de supervivencia, uno con baja viscosidad (mT-H) y otro con alta viscosidad (mT-H + 2% PVP) y dos tratamientos en un medio capacitante, uno con baja viscosidad (mT-BH) y otro con alta viscosidad (mT-BH + 2% PVP). En cada uno de los tratamientos la concentración fue de 20×10^6 espermatozoides ml^{-1} . Los espermatozoides se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 120 min en atmósfera de aire (mT-H y mT-H + PVP) o en atmósfera de 5% CO_2 /aire (mT-BH y mT-BH + PVP), ambos a un pH de 7,4. Se tomaron muestras de la suspensión espermáticas a 0, 60 y 120 min para evaluar diferentes parámetros espermáticos.

Análisis de parámetros espermáticos

Motilidad

La motilidad se estimó evaluando una alícuota de 10 μ l de la suspensión espermática obtenida, colocándola sobre un portaobjetos precalentado a 37 °C y cubriéndola con un cubreobjetos de 22 x 22 mm precalentado. La preparación se observó empleando un microscopio de contraste de fases y con la platina precalentada a 37 °C para evitar el shock térmico de las células. Se cuantificó el porcentaje de espermatozoides móviles, el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y la calidad de la motilidad individual (con una escala del 0 al 5, siendo 0 espermatozoides sin motilidad y 5 espermatozoides con un vigor máximo) de manera subjetiva por dos observadores experimentados, realizando un promedio entre ambos resultados.

Porcentajes de viabilidad espermática e integridad acrosómica

Los porcentajes de viabilidad espermática y de integridad acrosómica fueron evaluados en frotis teñidos con Eosina-Nigrosina y Giemsa. En primer lugar, se mezclaron 5 μ l de suspensión espermática y 10 μ l de Eosina-Nigrosina en un portaobjetos precalentado a 37°C. Una vez transcurridos 30 segundos se realizó un frotis y se dejó secar al aire. Los frotis fueron teñidos con posterioridad con Giemsa y se montaron con DePeX (Tamuli y Watson, 1994). En cada uno de los frotis se evaluaron 100 espermatozoides empleando un microscopio con un objetivo de 100x en campo claro. Los espermatozoides se consideraron viables cuando presentaban la región post-acrosomal sin teñir. Los espermatozoides que no presentaban reacción acrosómica espontánea, tenían el acrosoma intacto en la parte apical de la cabeza (Fig. 4).

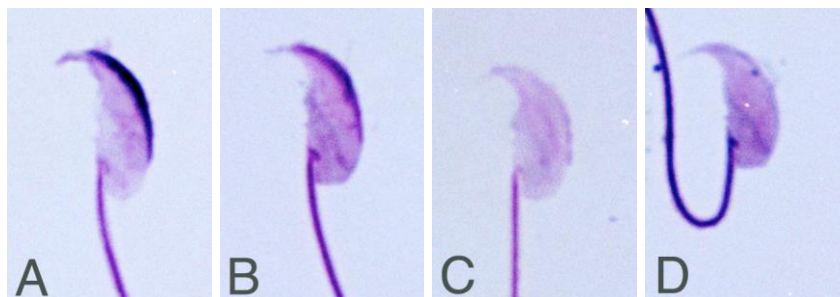


Figura 4. Espermatozoides de ratón teñidos con Eosina-Nigrosina y Giemsa. Pueden identificarse cuatro patrones diferentes: (A) vivo (sin tinción en la región post-acrosómica) y con acrosoma intacto, (B) muerto (teñido en la región postacrosómica) y con el acrosoma intacto, (C) vivo y sin acrosoma y (D) muerto y sin acrosoma (modificado de Magaña, 2004).

Capacitación

La capacitación se evaluó mediante tinciones fluorescentes empleando Hoechst 33258 como colorante vital y clortetraciclina (CTC) como marcador de capacitación. Se obtuvieron muestras de la solución espermática de cada uno de los tratamientos y tiempos de incubación y se tiñeron según se ha descrito previamente (Ward y Storey, 1984; Fraser y Herod, 1990). Se añadió Hoechst 33258 a la suspensión espermática, a una concentración de trabajo de 6 µg/ml. La suspensión se incubó durante 1 min a 37 °C en la oscuridad. Seguidamente la muestra fue centrifugada durante 3 min a 100 xg. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido con medio de incubación de cada uno de los tratamientos y fijado con una solución de 2,5% de glutaraldehído en tampón fosfato de sodio. La muestra resultante se guardó en oscuridad y a 4 °C (con un máximo de 12 horas) hasta el momento de su valoración. Inmediatamente antes de la evaluación la muestra fue teñida con CTC a una concentración de trabajo de 250 µM e incubada en la oscuridad durante 3 min a temperatura ambiente. La evaluación se realizó en un microscopio a un aumento de 1000x con un objetivo de inmersión de fluorescencia y contraste de fase simultáneamente. La viabilidad de los espermatozoides previa a la fijación se evaluó teniendo en cuenta la tinción, o ausencia de ella, con Hoechst 33258, utilizando un filtro de 330 nm y emisión de fluorescencia a través del espejo dicróico DM 400 (filtro Nikon UV-2A) (Fig. 5). Solo las células que no se tiñeron con Hoechst se consideraron viables. La capacitación se evaluó según los patrones de tinción de CTC en 100 células viables por muestra, usando un haz de excitación de mercurio con un filtro de 405 nm y emisión de fluorescencia con el espejo dicróico DM455 (filtro Nikon BV-2A). Se empleó contraste de fase para evaluar la presencia o ausencia del acrosoma (Fig. 6).

Los patrones de tinción observados en espermatozoides viables fueron los siguientes (Ward y Storey, 1984; Fraser y Herod, 1990) (Fig. 6):

- Patrón F: espermatozoide no capacitado. La cabeza está uniformemente teñida con CTC (Fig. 6A-C).
- Patrón B: espermatozoide capacitado. La región postacrosomal no se tiñe con CTC, observándose un contraste con la región acrosomal altamente teñida con CTC (Fig. 6D-F).
- Patrón AR: Sin presencia de acrosoma. La cabeza del espermatozoide no se tiñe con CTC (o está levemente teñida) (Fig. 6G-I).

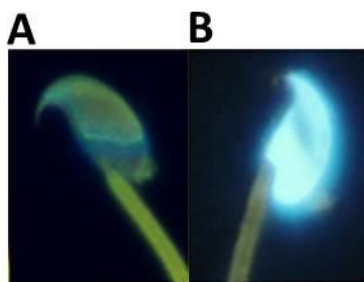


Figura 5. Patrones de tinción con Hoechst 33258 (viabilidad). Espermatozoide viable (A). Espermatozoide no viable (B). Imagen modificada de Martin-Coello (2008).

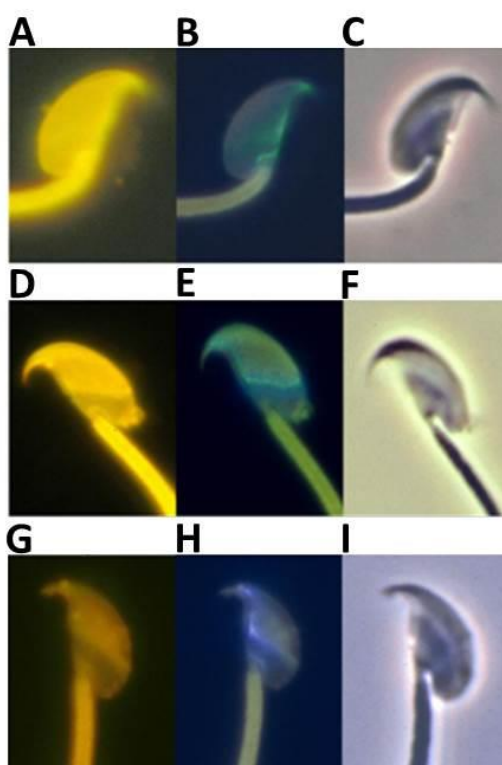


Figura 6. Patrones de tinción de espermatozoides de ratón con Hoechst 33258 (viabilidad) y con clortetraciclina (CTC) mostrando patrones funcionales de capacitación. CTC (A,D,G). Hoechst 33258 (B, E, H). Contraste de fase (C, F, I). Patrón F (A-C). Patrón B (D-F). Patrón AR (G-I). Imagen modificada de Martin-Coello (2018).

Cinética espermática

Para evaluar la cinética espermática se depositaron 6 μ l de suspensión espermática, a una concentración aproximada de $4-6 \times 10^6$ espermatozoides/ml, en una cámara de observación de vidrio de 20 μ m de profundidad (Standard Count-2 Chamber Slide 20-micron, Leja, Nieuw-Vennep, Países Bajos), precalentada previamente a 37 °C. La muestra se observó en microscopio con objetivo 4x en contraste de fase negativo sobre platina caliente a 37 °C. Mediante una cámara de vídeo (Balser A312fc Vision

Technologies, Glen Burnie, MD, USA), conectada al microscopio, y el software Sperm Class Analyzer (SCA, v. 6.0, Microptic, Barcelona, Spain), se filmaron 6 campos al azar con un mínimo de 150 espermatozoides por muestra, a una velocidad de 75 cuadros s^{-1} . El software se configuró con un tamaño máximo de partículas de $320 \mu m$, un tamaño mínimo de partículas de $50 \mu m$, una conectividad de 20, contraste de 600 y un brillo de 60. Todas las capturas de vídeo fueron analizadas y corregidas en los casos en los que fuese necesario. Se eliminaron las trayectorias en las cuales VAP era menor de $20 \mu m s^{-1}$, para eliminar las partículas y espermatozoides a la deriva. De los resultados obtenidos se evaluaron diferentes parámetros de natación de los espermatozoides (Fig. 7; Tabla 1)

Tabla 1. Descripción de los parámetros que describen la cinética espermática.

Parámetro	Definición
VCL	Velocidad curvilínea ($\mu m/s$)
VSL	Velocidad rectilínea ($\mu m/s$)
VAP	Velocidad media de la trayectoria ($\mu m/s$)
LIN	Linearidad (%) = $VSL / VCL \times 100$
STR	Rectitud (%) = $VSL / VAP \times 100$
WOB	Coefficiente de Wobble (%) = VCL / VAP
ALH	Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza ($\mu m/s$)
BCF	Frecuencia de cruce de batido (Hz)

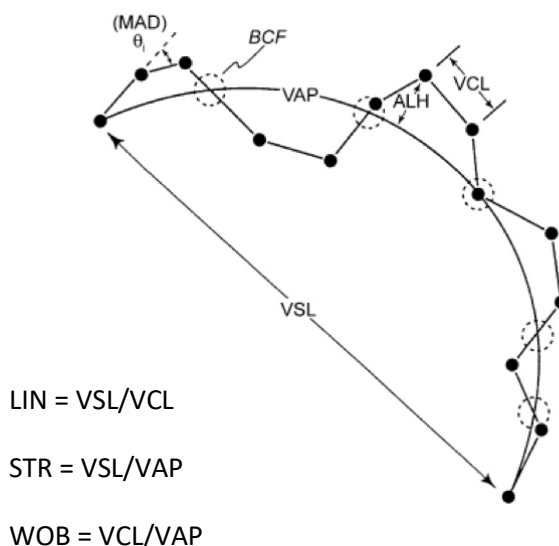


Figura 7. Descriptores de la natación espermática. VCL: velocidad curvilínea, VSL; velocidad rectilínea, VAP: velocidad media de la trayectoria, ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, BCF: frecuencia de cruce de batido flagelar, LIN: linearidad, STR: rectitud, WOB: coeficiente de Wobble.

Contenido de ATP

Para medir el contenido de ATP de los espermatozoides se utilizó un kit de bioluminiscencia de ATP (Tourmente et al., 2013, 2015a, b), basado en la luciferasa (Roche ATP Bioluminescence Assay Kit HS II, Roche Farma S.A., Madrid, España), que incluye un vial con ATP liofilizado, un vial con luciferasa liofilizada, el buffer de dilución y el buffer de lisis. Para medir la bioluminiscencia de cada una de las muestras se usaron placas opacas de 96 pocillos y un lector de placas con función de luminometría e inyectores automáticos (BioTek Sinergy HT, Winooski, Vermont, EEUU).

Se tomó una alícuota de 10 μl de suspensión espermática a una concentración aproximada de 20×10^6 espermatozoides/ml, y se añadió a 90 μl de medio mT-H y 100 μl de buffer de lisis. La muestra fue agitada empleando un vortex y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, la muestra fue centrifugada durante 2 minutos a 12.000 xg. Se recogieron 50 μl del sobrenadante y se añadieron a 450 μl de medio mT-H, congelando la muestra rápidamente en nitrógeno líquido para evitar la degradación del ATP, conservándolas a -80°C hasta el momento de su evaluación.

En el momento de la evaluación del contenido de ATP, se prepararon 6 estándares con una dilución seriada para la realización de una curva patrón (Tabla 2). Para preparar los estándares, se diluyó el estándar de ATP a una concentración de 16,5 mM, partiendo de la muestra de ATP solubilizado que incluye el kit, añadiendo 1 ml de buffer de dilución por cada 10 mg de ATP solubilizado. Con esa muestra de ATP, se realizó una nueva dilución a 1:1000, para obtener una concentración de 16,5 μM . Para conseguir la dilución de trabajo de 1 μM , se añadieron 20 μl de la solución de ATP, con una concentración de 16,5 μM , a 293,5 μl de medio mT-H y 16,5 μl de buffer de lisis. A esta última dilución se prepararon, a través de solución seriada, el resto de estándares.

Tabla 2. Estándares de ATP para realizar la curva patrón.

ID	[ATP]	μl de solución de ATP	μl mT-H	μl buffer de lisis
STD1	0,1 μM	30 (de 1 μM)	255	15
STD2	20 nM	60 (de 0,1 μl)	225	15
STD3	4 nM	60 (de 20 nM)	225	15
STD4	0,8 nM	60 (de 4 nM)	225	15
STD5	160 nM	60 (de 0,8 nM)	225	15
STD6	32 pM	60 (de 160 pM)	225	15
BLK	0	0	285	15

Una vez preparados los estándares, se descongelaron las muestras de ATP, y se cargaron junto con los estándares en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 50 μ l de muestra o estándar a cada pocillo, preparando muestras por triplicado.

Antes de proceder a la lectura en el lector de placas, se preparó la solución de luciferasa. Se añadieron 10 ml de buffer de dilución a la luciferasa liofilizada, se disolvió y se mantuvo durante 5 minutos a 0-4 °C. Una vez pasado ese tiempo, se procedió a añadir la mezcla de reacción al inyector automático del lector de placas. Se introdujo la placa en el lector de placas y se procedió a su lectura. Justo antes de tomar cada medida, se añadieron 50 μ l de luciferasa por auto-inyección en cada pocillo. Las medidas de luminiscencia se tomaron con un retraso de 1 segundo después de la microinyección y una lectura de 10 segundos de duración por pocillo.

Una vez obtenidos los valores de luminiscencia, se calcularon las cantidades de ATP de cada muestra, expresando los resultados como cantidad de ATP por espermatozoide. Conociendo la concentración de espermatozoides inicial (de 20×10^6 espermatozoides/ml) se calculó el número de espermatozoides de cada pocillo. Seguidamente se calculó la cantidad de ATP a partir de los valores de luminiscencia. En primer lugar se promediaron los valores de los valores triplicados. Si los valores sobrepasaban más del 10% del valor intermedio, se descartó ese valor. Una vez que obtuvieron los valores promedio, se restó el valor promedio del blanco a cada uno de los valores promedio tanto de las muestras como de los estándares. Una vez obtenidos los valores corregidos, con los valores estándares se realizó la ecuación de regresión a partir del gráfico logarítmico de la concentración de ATP y la concentración de bioluminiscencia. Una vez obtenida la curva, se calcularon las concentraciones de ATP en cada uno de las muestras. Una vez que obtenida la concentración de ATP y el número de espermatozoides en cada uno de los pocillos, se calculó la cantidad de ATP por espermatozoide (Tourmente et al., 2013; 2015a; b; 2018).

Estimación de la tasa de consumo de ATP

Para estimar la tasa de consumo de ATP se utilizaron un total de 6 machos de *M. musculus* B6D2F1 (Serie II) y 3 machos de *M. spicilegus* (Serie III). Una vez que se extrajeron los espermatozoides, como se ha descrito más arriba, las células espermáticas se incubaron a 37 °C durante 1 h en condiciones de supervivencia (mT-H) o en condiciones de capacitación (mT-BH) a una concentración de 20×10^6 spz/ml. Poco antes de finalizar la incubación, cada una de las suspensiones espermáticas se separó en dos alícuotas. Finalizada la incubación de 1 h, a una de las alícuotas de cada condición (supervivencia o capacitación) se le añadió un mezcla de inhibidores que consistía en inhibidores de OXPHOS: oligomicina (concentración final: 5 μ M), antimicina (concentración final: 1 μ M) y rotenona (concentración final: 1 μ M), y en un inhibidor de la glicólisis: 2DOG (concentración final: 50 mM) (Tabla 3). A las alícuotas control

de ambas condiciones se les añadió una concentración equivalente de DMSO (porcentaje final de 0,7 %), como control del solvente.

Las suspensiones espermáticas se incubaron a 37 °C durante 10 min adicionales. Para la cuantificación de ATP de los controles, se obtuvieron muestras de las alícuotas control de cada una de las dos condiciones dos minutos antes del inicio de esta incubación adicional y 12 min más tarde, es decir a los 58 y 70 min del tiempo total de incubación. En las alícuotas con adición de inhibidores se tomaron muestras para cuantificar el contenido de ATP cada 2 min desde el inicio de esta incubación adicional y durante 10 min, es decir desde los 60 min hasta los 70 min de incubación.

Para cuantificar el contenido de ATP, a la muestra de 100 µl de suspensión espermática se añadió el mismo volumen de buffer de lisis celular, y la suspensión resultante se congeló inmediatamente en N₂ líquido. Al finalizar cada uno de los experimentos las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugaron durante 2 min a 12000 xg. Seguidamente se recogieron 50 µl del sobrenadante y se añadieron a 450 µl de mT-H. La muestra resultante fue congelada de nuevo en N₂ líquido. La técnica utilizada para este estudio difiere ligeramente de la empleada en estudios anteriores (Tourmente et al., 2013; 2015a, b), pero un estudio preliminar permitió comprobar que no existen diferencias en los resultados (Tourmente et al., 2018). Los pasos que se siguieron para medir la bioluminiscencia con el kit basado en la luciferasa (Roche, ATP Bioluminescence Assay Kit HS II, Roche Farma S.A., Madrid, Spain) se describen en la sección de contenido de ATP, descrito más arriba.

Tabla 3. Moduladores del metabolismo.

Moduladores del metabolismo	Abreviatura	[] final de uso	Efecto sobre el metabolismo
Antimicina A	A	1 µM	Inhibición de OXPHOS
Rotenona	R	1 µM	Inhibición de OXPHOS
Oligomicina	Oligo	5 µM	Inhibición de ATP sintetasa
Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona	FCCP	1 µM	Desacoplante mitocondrial
Oxamato	Ox	30 mM	Inhibición de la glicólisis
2-Desoxy-D-Glucosa	2DOG	50 mM	Inhibición de glicólisis

Evaluación de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la tasa de acidificación extracelular (ECAR) en *Mus musculus* B6D2F1 (Serie II)

Para la evaluación de las tasas de respiración celular y glicólisis anaeróbica se empleó un analizador de flujo extracelular Seahorse XFp (Seahorse Bioscience, Agilent Technologies, Nueva York, NY, EE.UU) (Fig. 8). Este sistema analiza la tasas de consumo de oxígeno (OCR: $\text{pmol O}_2 \text{ min}^{-1}$) y de acidificación del medio extracelular (ECAR: mpH min^{-1}) en una población de células a tiempo real. La OCR permite estimar la velocidad de OXPHOS de dicha población, mientras que la ECAR responde a la cantidad de lactato liberado a medio, constituyendo una medida indirecta de la velocidad de glicólisis. Debido a que la evaluación de ECAR depende directamente de la variación del pH extracelular, no es posible utilizar tampones de pH en el medio de registro. Por tanto una vez concluida la hora de preincubación, momento en el cual *M. musculus* obtiene su máximo de capacitación (Serie I), de los espermatozoides en condiciones de supervivencia (mT-H) o capacitación (mT-BH) el medio fue remplazado por otro de composición similar pero en el que se excluyó el buffer Hepes (mT(-H)) (ver debajo), sustituyéndolo por NaCl y ajustando a un pH de 7,4 a 37 °C.

Para este conjunto de experimentos se utilizaron un total de 28 individuos de *M. musculus* B6D2F1, 2 individuos por cada experimento. Una vez obtenida la muestra espermática de dos individuos (1 epidídimo de cada individuo por condición), la concentración se ajustó a 100×10^6 células ml^{-1} , la cual se mantuvo durante toda el tiempo de preincubación.

Durante la hora de preincubación se prepararon los aditivos a usar en cada uno de los experimentos. Se utilizaron los siguiente reactivos: (Tabla 3): *Inhibidores de la OXPHOS*: Antimicina A (A, Sigma A8674) y Rotenona (R, Sigma R8875), que inhiben la cadena de transporte de electrones en los complejos III y I respectivamente, ambas a una concentración final de 1 μM y Oligomicina (Sigma O4876), como inhibidor de la ATP sintetasa, a una concentración final de 5 μM ; *Inhibidores de la glicólisis*: 2-Desoxy-D-Glucosa (2DOG, Sigma D8375), un análogo de la glucosa, que inhibe la glicólisis competitivamente, a una concentración final de 50 mM; *Desacoplante mitocondrial*: Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP, Sigma C2920), a una concentración final de 1 μM .

Transcurridos unos 40 min de incubación se procedió a cargar los aditivos correspondientes al experimento. Estos aditivos se cargaron en el cartucho del Seahorse XFp, previamente hidratado (con 200 μl de buffer de calibración de Seahorse, incubándolo durante 12 h como mínimo a 37 °C). Una vez realizado este procedimiento se introdujo el cartucho en el XFp para equilibrarlo. Una vez que los espermatozoides se preincubaron 1 h en cada medio, mT-H (condiciones de supervivencia) y mT-BH (condiciones de capacitación), se procedió a la siembra de los mismos en las placas del Seahorse XFp. En cada uno de los pocillos se añadieron 80 μl de suspensión espermática a una concentración de 100×10^6 células ml^{-1} . La placa constaba de un total de 8 pocillos. Dos se utilizaron como blancos, por lo que se añadió medio mT(-H) sin

espermatozoides. En tres de los pocillos se añadieron espermatozoides preincubados en condiciones de supervivencia (mT-H) y en los otros tres se añadieron espermatozoides preincubados en condiciones de capacitación (mT-BH). Una vez añadida la suspensión espermática correspondiente, se centrifugó la placa durante 1 min a 1300 xg a 37 °C en una dirección, y en las mismas condiciones en la otra dirección. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 200 µl de medio sin buffer mT(-H).

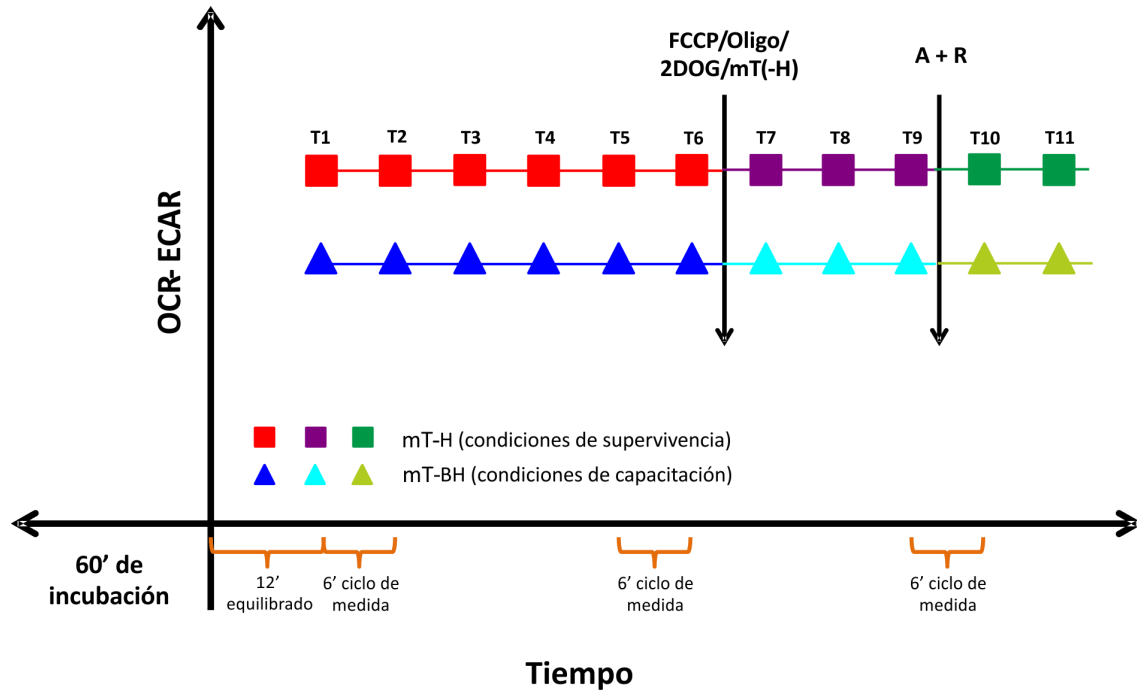


Figura 8. Esquema de los experimentos realizados en *M. musculus* con el analizador de flujo extracelular XFp (Seahorse Bioscience, Agilent Technologies, Nueva York, NY, EE.UU). Los espermatozoides se preincubaron durante 1 h en medio mT-H o en medio mT-BH, se diluyeron introduciéndolos en la placa con medio mT(-H), se centrifugaron durante 1 min a 1300 xg a 37°C en una dirección y en las mismas condiciones en la otra dirección, y finalmente se resuspendieron en medio mT(-H). Los espermatozoides se incubaron durante 72 min en el analizador de flujo y se expusieron a diferentes tratamientos mediante la inyección automática de diferentes compuestos en la suspensión espermática. Control: medio mT(-H). FCCP: carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (concentración final: 1µM). Oligo: Oligomicina (concentración final: 5 µM). 2DOG: 2-Desoxy-D-Glucosa (concentración final: 50 mM). AA+R: antimicina A + rotenona (concentración final en ambos inhibidores: 1 µM).

Se introdujo la placa con las muestras espermáticas en el Seahorse XFp. La primera medición se realizó pasados 12 min después de la introducción de la placa en el XFp. A partir de este momento cada medida se tomó cada 6 min (3 min para realizar la medida, 2 min para mezclar la suspensión que se encuentra en el pocillo y 1 min de espera). Después de la sexta medida (42 min de incubación), se añadieron los primeros aditivos, los cuales fueron: medio mT(-H) en el control, oligomicina (5 μM), FCCP (1 μM) o 2DOG (50 mM). Se tomaron otras tres medidas después de la adición de los moduladores metabólicos. Después de la novena medida (60 min de incubación) se añadió Antimicina (1 μM) y Rotenona (1 μM) a todos los pocillos a fin de eliminar la respiración mitocondrial y poder extraer los valores basales (Fig. 8). Una vez que se añadieron los últimos aditivos, se tomaron dos medidas más. El total de incubación de los espermatozoides en el Seahorse Xfp fue de 72 min.

Al finalizar el experimento, se extrajeron las muestras espermáticas de cada uno de los pocillos de la placa y se procedió a hacer recuento del número de espermatozoides en cada pocillo, a fin de obtener valores de OCR y de ECAR normalizados por espermatozoide.

Evaluación de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la tasa de acidificación extracelular (ECAR) en *Mus spicilegus* (Serie III)

Para evaluar la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la tasa de acidificación del medio extracelular (ECAR) en espermatozoides de *M. spicilegus* se empleó un analizador de flujo extracelular Seahorse XF24 (Seahorse Bioscience, Agilent Technologies, Nueva York, NY, EE.UU.) (Fig. 9). La OCR se evaluó a tiempo real a través de la medición de la concentración oxígeno en el medio extracelular, y se expresa como $\text{amol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ spz}^{-1}$. La ECAR fue estimada a través de la evaluación del pH extracelular, el cual es modificado por la liberación de lactato al medio por parte de las células espermáticas, y se midió en $\text{npH min}^{-1} \text{ spz}^{-1}$.

Para este conjunto de experimentos se utilizó un total de 14 individuos de *M. spicilegus*, empleando 2 individuos por experimento. Una vez que se extrajeron los espermatozoides de la manera antes mencionada, se separó la suspensión espermática en dos alícuotas y una se incubó en condiciones de supervivencia (no capacitante) en medio mT-H y la otra en condiciones que promueven la capacitación, en medio mT-BH, ambas durante 1 h, momento en el cual *M. spicilegus* obtiene su máximo de capacitación (Serie I). Durante el tiempo de incubación se prepararon los aditivos que se emplearon en cada uno de los experimentos. Se utilizaron los siguientes reactivos (ver Tabla 3): *Inhibidores de la OXPHOS*: Antimicina A (A, Sigma A8674) y Rotenona (R, Sigma R8875), inhibidores del complejo III (complejo ubiquinol – citocromo - c reductasa) y complejo I (complejo NADH – ubiquinona reductasa) de la cadena de transporte de electrones respectivamente, a una concentración final de 1 μM y Oligomicina (Ol, Sigma O4876) que bloquea el canal de protones de la ATP sintasa, a

una concentración final de 5 μM . *Inhibidores de la glicólisis*: 2-Desoxy-D-Glucosa (2DOG, Sigma D8375) que es un análogo de la glucosa que entra en la ruta glicolítica bloqueándola, a una concentración final de 50 mM y Oxamato (Ox, Sigma O2751), un inhibidor de la lactato deshidrogenasa, a una concentración final de 30 mM. *Desacoplante mitocondrial*: Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP, Sigma C2920) a una concentración final de 1 μM . En los pocillos destinados a medir un control negativo sin células se añadió medio Tyrode sin Hepes (mT(-H)). Durante el tiempo de preincubación se procedió a cargar el cartucho de Seahorse XF24, previamente hidratado con 1 ml de buffer de calibración durante 12 h como mínimo a 37 °C. Una vez cargados tanto los inhibidores como el medio, se procedió a introducir el cartucho en el analizador de flujo extracelular para equilibrarlo.

Finalizado el tiempo de preincubación de 1 h de los espermatozoides en cada una de las condiciones (supervivencia y capacitación), se procedió a la siembra de las suspensiones espermáticas en los pocillos de la placa para el analizador XF24. Con anterioridad, la base de cada pocillo había sido recubierta con laminina de ratón para asegurar la adherencia de los espermatozoides. 12 horas antes del experimento, a cada pocillo de la placa se le añadieron 30 μl de laminina de ratón (Invitrogen 23017-015) a una concentración de 0,2 mg/ml y se mantuvo a 4 °C. Justo antes del experimento, para retirar el exceso de laminina de cada uno de los pocillos, se enjuagó cada pocillo con 1 ml de agua miliQ.

La placa utilizada para cada experimento tiene un total de 24 pocillos que se distribuyeron de la siguiente manera: 4 pocillos se utilizaron como blancos, donde únicamente se añadió medio mT(-H), 10 pocillos se sembraron con espermatozoides preincubados en condiciones de supervivencia y los otros 10 pocillos se sembraron con espermatozoides preincubados en condiciones de capacitación. La concentración de ambas suspensiones espermáticas era de 100×10^6 spz ml^{-1} . Una vez que se añadió la suspensión espermática, la placa se centrifugó durante 1 min a 1200 xg a 37 °C en una dirección y en las mismas condiciones en la otra dirección, girando la placa 180°. Pasado ese tiempo se descartó el sobrenadante de cada pocillo y se añadieron 500 μl de medio mT(-H) a cada pocillo cuidando de que los espermatozoides no se despeguen del fondo.

Una vez que se sembraron los espermatozoides, se introdujo la placa en el equipo Seahorse XF24. La primera medida se tomó aproximadamente a los 25 min del inicio. Cada medida fue tomada aproximadamente cada 6 min (1 min de espera, 2 min en los cuales se mezcla la suspensión espermática y 3 min de medición). Las 4 primeras medidas fueron medidas basales. Justo después de la cuarta medida, a los 43 min de incubación, se añadieron los primeros aditivos a las concentraciones antes mencionadas: mT(-H) en los controles y oligomicina, FCCP, 2DOG u oxamato en los diferentes tratamientos. Después de la adición se tomaron otras 3 medidas. Una vez que se tomó la séptima medida, a los 61 min de incubación, se añadió Antimicina A + Rotenona a

todos los pocillos y se tomaron 2 últimas medidas finales. El tiempo total de incubación en el Seahorse XF24 fue de 73 min (Fig. 9).

Una vez terminas las mediciones, se resuspendieron los espermatozoides y se recogió la suspensión espermática de cada uno de los pocillos de la placa para realizar un recuento del número de espermatozoides en cada pocillo y normalizar las medidas de OCR y ECAR.

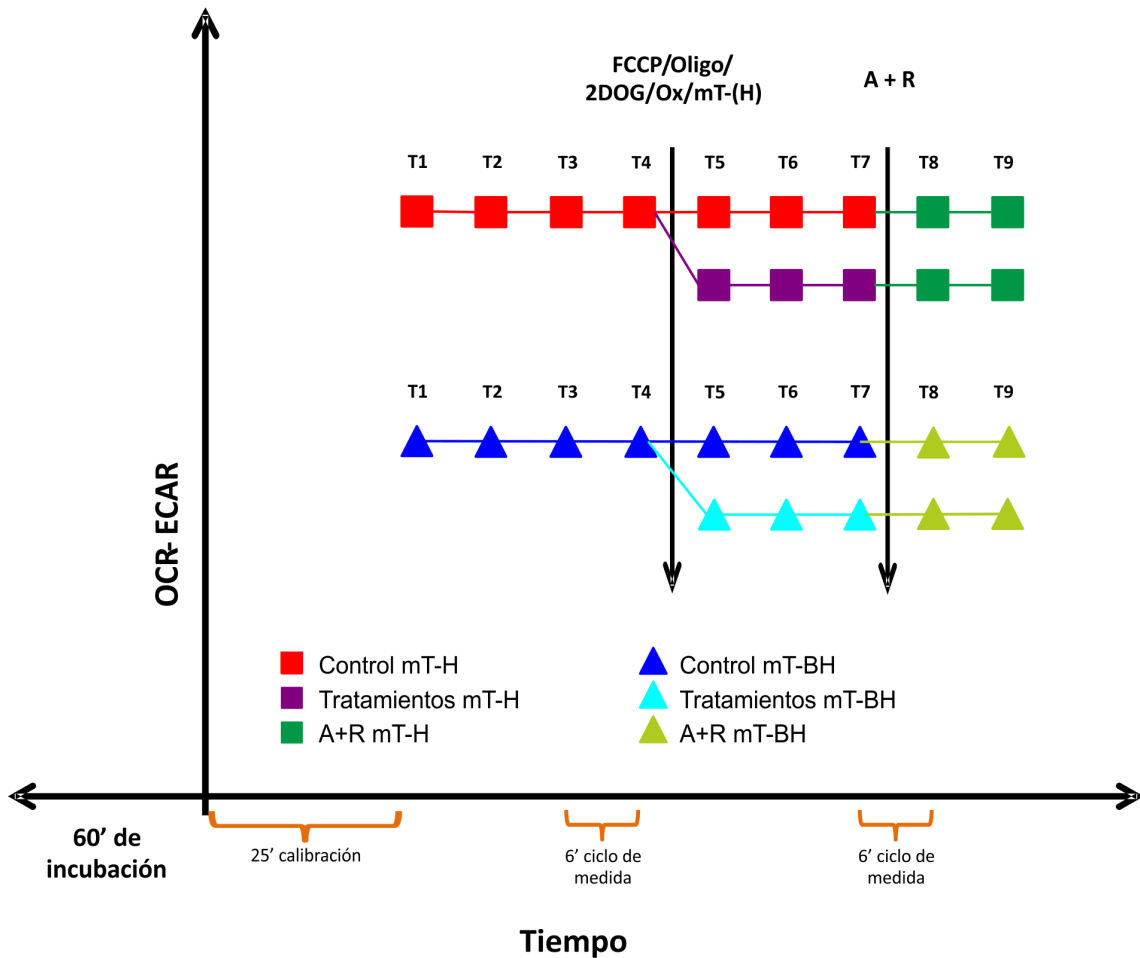


Figura 9. Esquema de los experimentos realizados en *M. spicilegus* utilizando el analizador de flujo extracelular Seahorse XF24. Los espermatozoides de *M. spicilegus* se preincubaron a 37 °C durante 1 h en condiciones de supervivencia (medio mT-H, aire) o en condiciones de capacitación (medio mT-BH, 5% CO₂/aire) y después se prepararon para mediciones en el analizador de flujo extracelular (ver Material y Métodos). Los espermatozoides se incubaron durante 73 min en el analizador de flujo y se expusieron a diferentes tratamientos mediante la inyección automática de diferentes compuestos en la suspensión espermática. Control: mT(-H). FCCP: carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (concentración final: 1 μM). Oligo: Oligomicina (concentración final: 5 μM). 2DOG: 2-Desoxy-D-Glucosa (concentración final: 50 mM). Ox: oxamato (concentración final: 30 mM). A + R: antimicina A + rotenona (concentración final en ambos inhibidores: 1 μM).

Análisis estadístico

Serie I: Metabolismo energético durante la capacitación e hiperactivación en espermatozoides de tres especies de ratón (*Mus musculus*, *Mus spretus* y *Mus spicilegus*)

Tamaño muestral - El tamaño muestral de esta serie varió entre 6 y 8 individuos por especie (*M. musculus* 7 individuos, *M. spretus* 8 individuos y *M. spicilegus* 6 individuos).

Porcentaje de hiperactivación - El porcentaje de hiperactivación se estimó en función de los parámetros de natación evaluados. Se construyeron histogramas de frecuencias y se seleccionó el parámetro de natación que registró el mayor cambio de frecuencia entre tratamientos. En nuestro conjunto de datos, se observó que ALH aumentaba con el tiempo en condiciones de capacitación (incubaciones en medio mT-BH), mientras que permanecía sin cambio en un medio de supervivencia (mT-H). Otros estudios habían observado previamente el mismo comportamiento, por lo que se ha recomendado el uso de ALH como indicador de la hiperactivación en espermatozoides (Cancel et al., 2000; Goodson et al., 2011). Los intervalos de distribución de ALH se estimaron para las muestras de control a 0, 30, 60 y 90 min de incubación utilizando la media \pm 1 desviación estándar como límites. Los espermatozoides en las muestras de tratamiento de capacitación se clasificaron como hiperactivados cuando el valor de ALH superó el límite máximo de distribución de frecuencia de ALH para su respectivo tiempo de incubación (Fig. 10).

Análisis - Las variables fueron transformadas por el logaritmo en base 10, excepto los porcentajes que fueron transformadas a través del arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción. Se realizaron análisis de la varianza de medidas repetidas (ANOVAs) para cada una de las variables, utilizando el tiempo y el tratamiento como factores fijos y el individuo como factor aleatorio. También se realizó un test post hoc de Fisher LSD para cada uno de los tratamientos y para cada uno de los tiempos de incubación. Además se realizó un análisis de correlaciones de Pearson entre los espermatozoides incubados en un medio de supervivencia (mT-H) y un medio de capacitación (mT-BH), y también dentro de cada medio de incubación, se analizaron las diferencias las diferentes entre los distintos tiempos. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con IBM SPSS statistics v20 con una significancia de $\alpha = 0,05$.

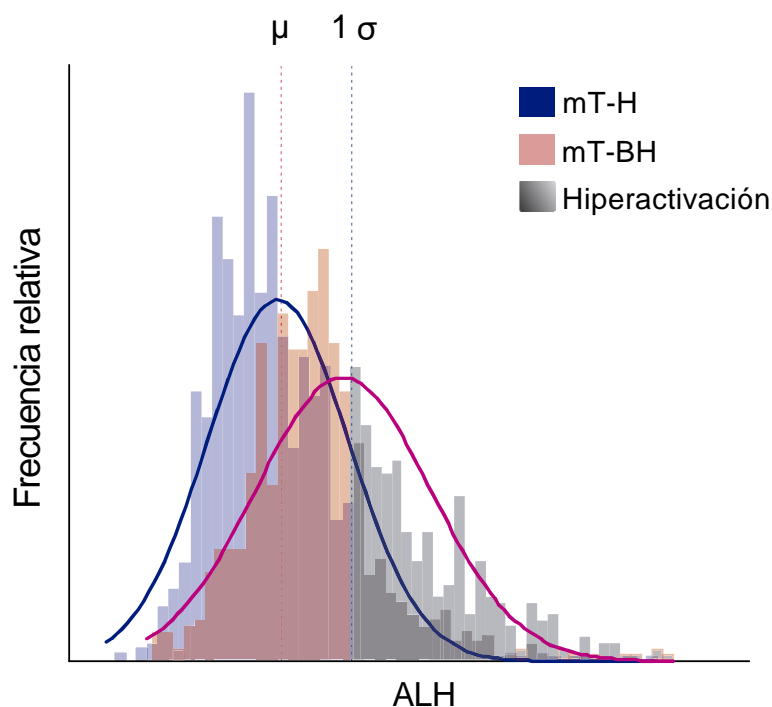


Figura 10. Histograma de frecuencia relativa de ALH en condiciones de supervivencia y en condiciones de capacitación. Las barras azules y la línea azul marcan las condiciones de supervivencia. Las barras rosas y la línea rosa marcan las condiciones de capacitación. Los espermatozoides hiperactivados en cada uno de los medios se tomaron a partir de una desviación estándar de la media. Los espermatozoides hiperactivados están representados con diferentes tonos de gris.

Series II y III: Producción y consumo de ATP en espermatozoides no capacitados y capacitados de *M. musculus* B6D2F1 y *M. spicilegus*. Papel de la glicólisis y fosforilación oxidativa en la generación de energía.

Tamaño muestral – En cada uno de estas dos series se realizaron dos conjuntos de experimentos. *Serie II*: para la evaluación de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la tasa de acidificación del medio extracelular (ECAR) con el Seahorse XFp, se utilizaron un total de 28 individuos de *M. musculus* B6D2F1, dos individuos por cada experimento. Para la estimación de la tasa de consumo de ATP se utilizaron un total de 6 individuos de *M. musculus* B6D2F1. *Serie III*: para la evaluación de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la tasa de acidificación del medio extracelular (ECAR) con el Seahorse XF24, se utilizaron un total de 14 individuos de *M. spicilegus*, empleando 2 individuos por experimento. Para la estimación de la tasa de consumo de ATP se utilizaron un total de 3 individuos de *M. spicilegus*.

Tasas de Oxphos y glicólisis - Con los resultados obtenidos de OCR en *M. musculus* B6D2F1 (Seahorse XFp; Serie II) y en *M. spicilegus* (Seahorse XF24; Serie III), tanto en el control, como con los inhibidores, y el desacoplante mitocondrial, se calcularon los siguientes parámetros: *respiración basal* (promedio de valor de cada uno de los

pocillos control – promedio del valor de cada uno pocillos con la adición de A + R en cada uno de los experimentos realizados), *producción de ATP* (promedio del valor de cada uno de los pocillos control – promedio del valor cada uno de los pocillos con la adición de oligomicina en cada uno de los experimentos realizados), *fuga de protones* (promedio del valor de cada uno de los pocillos con presencia de oligomicina – promedio del valor de cada uno de los pocillos con adición de A + R en cada uno de los experimentos), *respiración máxima* (promedio del valor de cada uno de los pocillos con presencia de FCCP – promedio del valor de cada uno de los pocillos con presencia de A + R en cada uno de los experimentos) y *capacidad respiratoria sobrante* (promedio del valor de cada uno de los pocillos en presencia de FCCP – promedio del valor de cada uno de los pocillos control en cada uno de los experimentos realizados).

Con los valores de ECAR también se calcularon la *glicólisis basal* (promedio del valor de cada uno de los pocillos control – promedio del valor de cada uno de los pocillos con presencia de 2DOG en cada uno de los experimentos) y la *reserva glicolítica* (promedio del valor de cada uno de los pocillos en presencia de oligomicina – promedio del valor de cada uno de los pocillos control en cada uno de los experimentos).

Análisis - Todas las variables fueron transformadas en \log_{10} para los análisis, a excepción de las variables de porcentajes, que fueron transformadas al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción. Los análisis estadísticos se realizaron usando R (versión 3.5.3) implementado por los paquetes *lm4* (Bates et al., 2015), *emmeans* (Lenth, 2019), *boot* (Canty y Ripley, 2017) y *ggplot2* (Wickham, 2016) con un $\alpha = 0,05$.

El porcentaje de capacitación, según los resultados de tinción espermática con Hoechst 33258 y CTC, fue evaluado entre el tiempo 0 y 60 min de incubación usando un modelo lineal mixto, con el medio de incubación (2 niveles: mT-H y mT-BH) y el tiempo (2 niveles: 0, 60 min) como factores fijos y el individuo como factor aleatorio.

El efecto sobre OCR y ECAR de adición tanto de los inhibidores como de los estimuladores, en ambas condiciones de incubación fueron analizados con un modelo lineal mixto, usando como factores fijos el medio de incubación (2 niveles: mT-H y mT-BH) y el tratamiento (4 niveles en OCR: control, oligomicina, FCCP, A + R y 3 niveles en ECAR: control, oligomicina, 2DOG) y el experimento como factor aleatorio. Las diferencias entre condiciones fueron analizadas con un análisis post hoc de Tukey.

Para analizar el efecto del medio de incubación en cada una de las tasas calculadas, tanto para OCR (respiración basal, producción de ATP, fuga de protones, respiración máxima y capacidad respiratoria sobrante) como para ECAR (glicólisis basal y reserva glicolítica), se realizó un modelo lineal mixto utilizando el medio como un factor fijo (2 niveles: mT-H y mT-BH) y el experimento como factor aleatorio. También se realizó un análisis post hoc de Tukey.

El consumo de ATP a lo largo del tiempo se estimó mediante un modelo no lineal ($Y = aX^b$) para las condiciones de supervivencia con inhibidores (mT-H + inhibidores) como para las condiciones de capacitación con inhibidores (mT-BH + inhibidores). Una vez

estimados el intercepto (“a”) como la pendiente (exponente “b”) para las ecuaciones de consumo, se calcularon sus límites de confianza del 95%.

Serie IV: Efecto de la viscosidad sobre la producción energética durante la supervivencia y la capacitación de espermatozoides de tres especies de ratón (*Mus musculus*, *Mus spretus* y *Mus spicilegus*)

Tamaño muestral - El tamaño muestral de esta serie varió entre 4 y 5 individuos por especie (*M. musculus* 4 individuos, *M. spretus* 5 individuos y *M. spicilegus* 4 individuos).

Análisis de componentes principales de descriptores de natación espermática - Los parámetros espermáticos están altamente correlacionados (Gómez-Montoto et al., 2011b). El análisis de componentes principales (PCA) se realizó para obtener unas variables resumidas que integran la información de la cinética espermática de cada una de las especies. Las variables de natación se dividieron en dos grupos para cada una de las especies: variables de velocidad y variables de trayectoria (ver Fig. 11, Tabla 4).

(A) OSV (*Overall Sperm Velocity*). Los componentes principales fueron construidos utilizando tres variables de velocidad: velocidad rectilínea (VSL), velocidad curvilínea (VCL) y velocidad media de la trayectoria (VAP). El primer componente principal (OSV 1) representó el 94,2% de la variabilidad total en *M. musculus*, el 97,6% en *M. spretus* y 92,2% en *M. spicilegus*. Los valores de cada uno de los tres parámetros de velocidad de los espermatozoides se correlacionan significativamente con OSV 1 (Tabla 4). El segundo componente principal solo representó el 7,2% en *M. musculus*, el 2,2% en *M. spretus* y 5,4% en *M. spicilegus*. Debido al alto porcentaje de variabilidad explicada por OSV 1, ésta será es la única variable que se utilizará en los análisis.

(B) OTS (*Overall Trajectory Shape*) - Los componentes principales fueron construidos utilizando cinco variables de forma de la trayectoria: linealidad (LIN), rectitud (STR), coeficiente de wobble (WOB), desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de cruce del batido flagelar (BCF). El primer componente principal (OTS 1) representó el 64,5% de la variabilidad en *M. musculus*, 49,4% en *M. spretus* y 65,8% en *M. spicilegus*. El segundo componente principal (OTS 2) representó el 26,2% de la variabilidad en *M. musculus*, 37,2% en *M. spretus* y 27,8% en *M. spicilegus*. El peso de cada una de las variables en cada uno de los componentes principales varió en función de la especie. Por tanto, ambos componentes principales, OTS1 y OTS2, explican la forma de la trayectoria de los espermatozoides en cada uno de los tratamientos y en cada uno de los tiempos (Tabla 4).

Otros análisis - Para todos los análisis estadísticos se utilizó el software estadístico SPSS Statistics 23.0 (IBM, Armonk, New York, US) e InfoStat 2017 (FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Se realizaron análisis de medidas repetidas (ANOVAs) usando el tratamiento (mT-H, mT-H + PVP, mT-BH y mT-BH +

PVP) y el tiempo (0, 60 y 120 min) como variables fijas, y el individuo como variable aleatoria para cada una de las especies. Además se utilizó el test post-hoc de Fisher LSD para cada uno de los tratamientos y de los tiempos. La significación estadística fue de 0,05 ($\alpha = 0,05$).

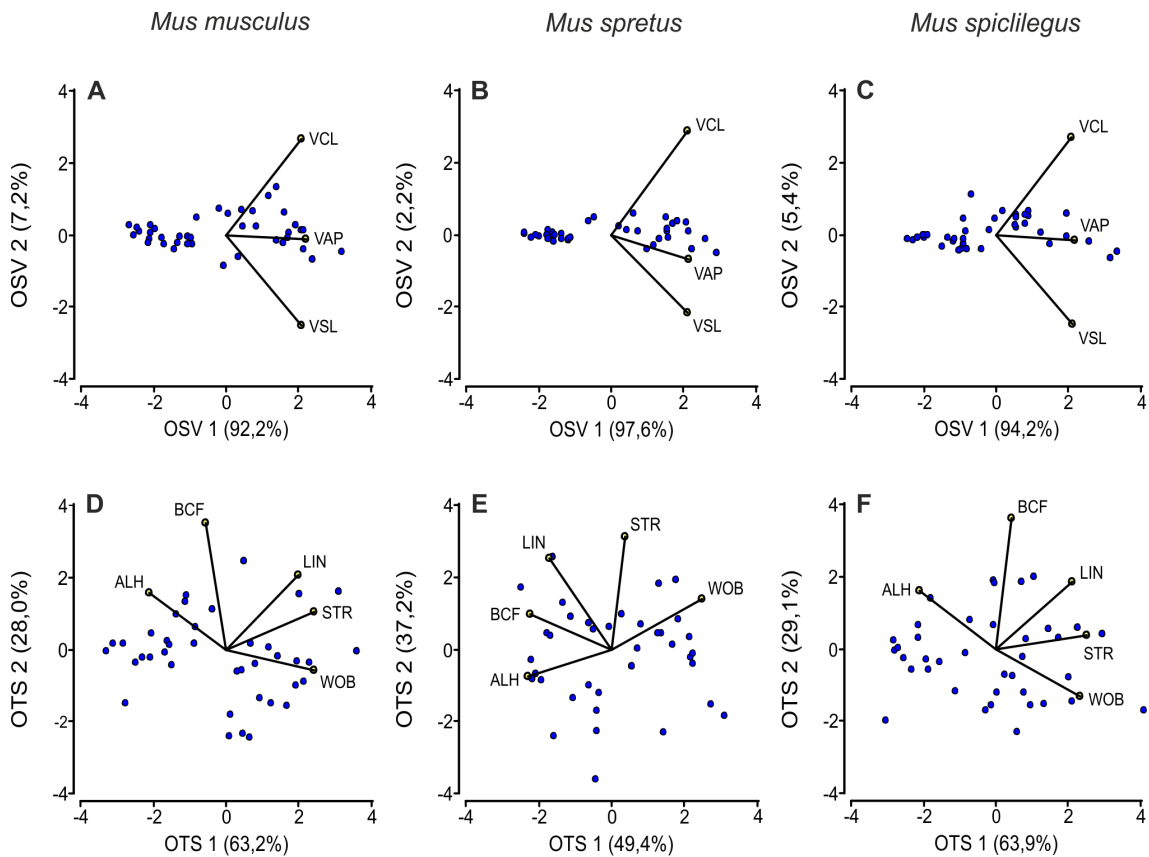


Figura 11. Análisis de componentes principales de parámetros de natación en espermatozoides de tres especies de ratones (*M. musculus*, *M. spretus* y *M. spicilegus*) en dos condiciones de incubación. A-C: Componentes principales de velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL) y velocidad media de la trayectoria (VAP). En el eje x está representado el componente principal 1 (OSV 1) y en el eje y está representado el componente principal 2 (OSV 2). D-F: Componentes principales de linealidad (LIN), rectitud (STR), coeficiente de Wobble (WOB), desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia del batido flagelar (BCF). En el eje x está representado el componente principal 1 (OTS 1) y en el eje y está representado el componente principal 2 (OTS 2). A, D: *M. musculus*, B, E: *M. spretus*, C, F: *M. spicilegus*.

Tabla 4. Peso de cada una de las variables en cada componente principal y correlación de Pearson, tanto en velocidad total ("Overall Sperm Velocity; OSV) como en trayectoria de natación ("Overall Trajectory of Spermatozoa"; OTS) para *M. musculus*, *M. spretus* y *Mus spicilegus*. Los valores en negrita indican correlaciones significativas entre las variables originales y los componentes principales ($p < 0,05$).

	<i>Mus musculus</i>				<i>Mus spretus</i>				<i>Mus spicilegus</i>									
	OSV1		OSV2		OTS1		OTS2		OSV1		OSV2		OTS1		OTS2			
	Peso	r_{xy}	Peso	r_{xy}	Peso	r_{xy}	Peso	r_{xy}	Peso	r_{xy}	Peso	r_{xy}	Peso	r_{xy}	Peso	r_{xy}		
VCL	0,56	0,94	0,73	0,34			0,57	0,98	0,78	0,98			0,57	0,94	0,73	0,94		
VSL	0,57	0,95	-0,69	-0,32			0,58	0,02	-0,59	1,00			0,57	0,05	-0,68	1,00		
VAP	0,60	0,99	-0,03	-0,02			0,58	0,002	-0,18	1,00			0,59	0,003	-0,04	1,00		
LIN			0,47	0,78	0,39	0,54			-0,38	-0,60	0,57	0,78			0,47	0,83	0,37	0,49
STR			0,54	0,99	0,16	0,27			0,08	0,13	0,71	0,96			0,54	0,98	0,05	0,09
WOB			0,52	0,95	-0,19	-0,15			0,56	0,89	0,31	0,43			0,50	0,91	-0,31	-0,35
ALH			-0,47	-0,83	0,30	0,41			-0,52	-0,82	-0,17	-0,24			-0,45	-0,83	0,37	0,42
BCF			-0,04	-0,22	0,83	0,92			-0,51	-0,80	0,22	0,29			0,15	0,18	0,79	0,95

Resultados

Serie I

Metabolismo energético durante la capacitación e hiperactivación en espermatozoides de tres especies de ratón (*Mus musculus*, *Mus spretus* y *Mus spicilegus*)

Viabilidad y motilidad

En *M. musculus* se observó una leve disminución en el porcentaje de espermatozoides vivos a lo largo del tiempo ($F = 4,059$, $p = 0,013$), aunque no hubo diferencias significativas entre los espermatozoides incubados en mT-H (control, condiciones de supervivencia) o mT-BH (condiciones de capacitación) ($F = 0,083$, $p = 0,775$) (Fig. 12A; Tabla 5). En *M. spretus* (Fig. 12B; Tabla 5), la viabilidad fue constante a lo largo de todo el tiempo de incubación ($F = 0,887$, $p = 0,445$) pero se observaron leves diferencias (aunque estadísticamente significativas) entre tratamientos ($F = 4,609$, $p = 0,037$). En *M. spicilegus*, el porcentaje de espermatozoides vivos no mostró cambios significativos a lo largo del tiempo ($F = 0,371$, $p = 0,774$) o entre tratamientos ($F = 0,342$, $p = 0,563$) (Fig. 12C; Tabla 5).

En *M. musculus* el porcentaje de espermatozoides móviles disminuyó a lo largo del tiempo en ambos medios, pero no se observaron diferencias entre ellos (Fig. 12D; Tabla 5). Por otro lado, en *M. spretus* y *M. spicilegus* si bien la motilidad de los espermatozoides descendió con el tiempo, se observaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides móviles entre los dos medios incubación. El porcentaje de espermatozoides móviles descendió de manera más pronunciada en el medio de capacitación que en el medio de supervivencia. (Fig. 12E,F; Tabla 5). La disminución en el porcentaje de espermatozoides móviles con el tiempo en ambos tratamientos fue más pronunciada en *M. musculus*.

Cinética espermática

Los espermatozoides incubados en el medio de capacitación (mT-BH) presentaron valores menores en las variables de velocidad (VCL y VSL) en las tres especies, aunque se observaron diferencias entre ellas. En *M. musculus*, la VCL (Fig. 13A; Tabla 5) se mantuvo constante a lo largo del tiempo en mT-H y mT-BH y solo disminuyó significativamente a los 90 min con respecto al tiempo inicial. En comparación al tiempo inicial de incubación, la VSL mostró una disminución significativa en mT-BH a los 30 min y una ligera disminución en mT-H a los 60 min (Fig. 13D; Tabla 5).

En *M. spretus*, VCL se mantuvo estable a lo largo del tiempo de incubación en los dos medios (Fig. 13B, Tabla 5), mientras que la VSL disminuyó de manera constante en ambos medios a partir de los 30 min. (Fig. 13E; Tabla 5).

Para los espermatozoides de *M. spicilegus* incubados en mT-H no se observaron diferencias significativas en la VCL a lo largo del tiempo, pero sí se observó una ligera disminución en VSL a los 60 min. Por otro lado, los espermatozoides de *M. spicilegus* incubados en mT-BH presentaron disminuciones significativas en los valores de VCL y VSL a lo largo del tiempo, observándose una caída muy pronunciada de la VSL desde el inicio de la incubación hasta los 60 min (Fig. 13C,F; Tabla 5).

El desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) fue la única variable que mostró valores más altos en los espermatozoides incubados en condiciones de capacitación (mT-BH) que en condiciones de supervivencia (mT-H). Los espermatozoides de *M. musculus* y *M. spicilegus* incubados en mT-BH mostraron un aumento en los valores de ALH a lo largo del tiempo (Fig. 14A,C; Tabla 5), pero en *M. spretus* los valores de ALH de los espermatozoides incubados en un medio capacitante fueron mayores a lo largo de todo el tiempo de incubación (Fig. 14B, Tabla 5).

En *M. musculus*, LIN se mantuvo constante a lo largo del tiempo, con excepción de una disminución brusca a los 30 min en los espermatozoides incubados en el medio de capacitación (Fig. 14D; Tabla 5). En *M. spretus* los valores de LIN en el medio capacitante fueron significativamente menores que en el medio de supervivencia. Ambos medios de incubación mostraron una caída significativa a los 60 min, manteniendo las diferencias entre espermatozoides en estado de supervivencia (mT-H) y espermatozoides en estado de capacitación (mT-BH) (Fig. 14E; Tabla 5). En *M. spicilegus*, los espermatozoides incubados en condiciones de supervivencia mostraron valores de LIN constantes a lo largo del tiempo, con una ligera disminución a los 60 min, mientras que los valores en un medio capacitante decrecieron a lo largo del tiempo de incubación (Fig. 14F; Tabla 5).

En cuanto a la frecuencia de cruce de batido (BCF), en *M. musculus* se observó que los valores se mantienen a lo largo del tiempo en ambos medios, aunque en condiciones de capacitación fueron menores que en condiciones de supervivencia. (Fig. 14G; Tabla 5). En *M. spretus*, los valores de BCF aumentaron significativamente con el tiempo en ambos medios de incubación (Fig. 14H; Tabla 5). En *M. spicilegus*, BCF se mostró estable a lo largo del tiempo en condiciones de supervivencia, pero experimentó una disminución a lo largo del tiempo en condiciones de capacitación (Fig. 14I; Tabla 5).

Contenido de ATP

Los resultados revelaron una disminución en el contenido de ATP a lo largo del tiempo en los espermatozoides incubados en ambos medios en las tres especies (Fig. 15A-C; Tabla 5). En *M. musculus*, el contenido de ATP disminuyó significativamente y con intensidad similar en ambos medios. En *M. spretus*, disminuyó en ambos medios a lo largo del tiempo, pero con mayor intensidad en condiciones de capacitación. En *M. spicilegus* solo disminuyó en condiciones de capacitación.

Capacitación

El porcentaje de espermatozoides vivos que muestran el patrón B (indicativo de capacitación) cuando se tiñó con clortetraciclina (CTC) se evaluó a lo largo del tiempo en células incubadas tanto en el medio de supervivencia (mT-H) como en el medio de capacitación (mT-BH). El porcentaje de células con patrón B se mantuvo estable a lo largo del tiempo en los espermatozoides incubados en un medio de supervivencia (valores promedio: 11% en *M. musculus*, 14% en *M. spretus* y 12% en *M. spicilegus*) (Fig. 16A-C; Tabla 5). Por otro lado, el porcentaje de células vivas con el patrón B aumentó con el tiempo en los espermatozoides incubados bajo condiciones de capacitación, pero se encontraron diferencias entre las especies (Fig. 16A-C). En *M. musculus* se observó un incremento menor en el porcentaje de espermatozoides con patrón B que en las otras especies (41,6% a los 90 min). En esta especie la proporción de células espermáticas con patrón B alcanzó el pico máximo a los 60 min de incubación, y permaneció estable hasta los 90 min (Fig. 16A). Los espermatozoides de *M. spretus* presentaron un incremento intermedio en porcentajes de células con el patrón B (61,2% a los 90 min), alcanzando su valor máximo al final de la incubación de 90 min (Fig. 16B). Los espermatozoides de *M. spicilegus* alcanzaron el mayor porcentaje de patrón B (71%), que se observó a los 60 min incubación, y se mantuvieron a los 90 min (Fig. 16C) (Tabla 5).

Hiperactivación

La proporción de células con motilidad hiperactivada se calculó teniendo en cuenta los patrones de natación que se identificaron en los espermatozoides (ver Material y Métodos). La amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) mostró el mayor cambio de frecuencia entre los espermatozoides incubados en condiciones de supervivencia y de capacitación y, por tanto, sirvió como marcador para la hiperactivación. El porcentaje de células hiperactivadas aumentó con el tiempo en *M. musculus* y *M. spicilegus* cuando éstas se incubaron en el medio capacitante. Los valores máximos se alcanzaron a los 90 min en ambas especies (30% de espermatozoides hiperactivados en *M. musculus* y 40% en *M. spicilegus*). Los espermatozoides incubados en condiciones de supervivencia mostraron valores bajos de hiperactivación a lo largo del tiempo en estas dos especies (16 % en *M. musculus* y 15% en *M. spicilegus*) (Fig. 16D,F; Tabla 5). En contraste, en *M. spretus* el porcentaje de hiperactivación se mantuvo estable durante todo el tiempo de incubación en ambos medios, aunque los valores en condiciones de capacitación siempre fueron significativamente mayores que en condiciones de supervivencia (22 % de células hiperactivadas en condiciones de capacitación y 16 % en condiciones de supervivencia) (Fig. 16E; Tabla 5).

Se observó una correlación significativa entre el patrón de capacitación estimado por tinción con clortetraciclina y el patrón de espermatozoides hiperactivados en dos de las especies estudiadas, *M. musculus* y *M. spretus* (Tabla 6). Estos resultados parecen

indicar que los procesos de capacitación y de hiperactivación están altamente correlacionados y son simultáneos en estas dos especies.

Los espermatozoides incubados en condiciones de capacitación se analizaron según su ALH, clasificándolos en dos subpoblaciones de espermatozoides con diferentes patrones de motilidad: no hiperactivados e hiperactivados. Una vez que se establecieron ambas subpoblaciones, en cada una de ellas se analizaron sus patrones de natación. Los espermatozoides hiperactivados mostraron valores de VCL significativamente más altos que las células no hiperactivadas en las tres especies (Fig. 17A-C; Tabla 7). Estas diferencias fueron evidentes al inicio de la incubación (0 min) en *M. musculus* y *M. spretus* y a partir de los 60 min en *M. spicilegus*. Los valores de VSL en espermatozoides hiperactivados y no hiperactivados disminuyeron a lo largo del tiempo en las tres especies (Fig. 17D-F; Tabla 7), con valores significativamente más bajos en los espermatozoides hiperactivados de *M. spretus* y *M. spicilegus* a lo largo de todo el tiempo de incubación (Fig. 17E,F; Tabla 7).

La linealidad (LIN) mostró una disminución significativa con el tiempo tanto en los espermatozoides no hiperactivados como en los hiperactivados en las tres especies, y los valores fueron siempre mayores en los espermatozoides no hiperactivados (Fig. 18A-C; Tabla 7). Los valores de la frecuencia de cruce de batido (BCF) en *M. musculus* fueron estables a lo largo del tiempo y similares entre ambos grupos de espermatozoides (no hiperactivados e hiperactivados) (Fig. 18D; Tabla 7). En *M. spretus*, BCF aumentó con el tiempo en ambos grupos de espermatozoides, pero los espermatozoides hiperactivados mostraron valores significativamente más altos a lo largo de todo el tiempo (Fig. 18E; Tabla 7). En *M. spicilegus* los valores de BCF se mantuvieron estables en ambos grupos de espermatozoides durante todo el tiempo de incubación, pero los espermatozoides hiperactivados mostraron valores significativamente menores que los espermatozoides no hiperactivados (Fig. 18F; Tabla 7).

Tabla 5. Efectos de las condiciones de incubación y del tiempo sobre viabilidad, motilidad, parámetros de velocidad (VCL, VSL, LIN, ALH y BCF), contenido de ATP, porcentaje de capacitación y porcentaje de hiperactivación en los espermatozoides de tres especies de ratones (*M. musculus*, *M. spretus* y *M. spicilegus*). Los valores *F* y *p* corresponden a una ANOVA de medidas repetidas, utilizando los individuos como factor aleatorio y las condiciones de incubación y el tiempo como factores fijos. Los resultados resaltados en negrita marcan diferencias significativas ($p < 0,05$) en el análisis estadístico.

		<i>Mus musculus</i>		<i>Mus spretus</i>		<i>Mus spicilegus</i>	
		<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Viabilidad	Tratamiento	0,083	0,775	4,609	0,037	0,342	0,563
	Tiempo	4,059	0,013	0,887	0,455	0,371	0,774
	Interacción	0,722	0,545	0,616	0,608	0,357	0,784
Motilidad	Tratamiento	0,430	0,515	42,760	<0,0001	50,392	<0,0001
	Tiempo	46,125	<0,0001	32,808	<0,0001	32,820	<0,0001
	Interacción	0,091	0,965	5,113	0,004	7,858	<0,0001
VCL	Tratamiento	9,589	0,003	44,188	<0,0001	43,855	<0,0001
	Tiempo	1,565	0,212	0,616	0,608	12,069	<0,0001
	Interacción	1,326	0,279	0,204	0,893	5,682	0,003
VSL	Tratamiento	46,589	<0,0001	38,894	<0,0001	102,109	<0,0001
	Tiempo	10,256	<0,0001	7,257	<0,0001	26,792	<0,0001
	Interacción	0,790	0,506	0,251	0,860	9,035	<0,0001
LIN	Tratamiento	29,628	<0,0001	27,362	<0,0001	115,201	<0,0001
	Tiempo	13,164	<0,0001	10,630	<0,0001	28,892	<0,0001
	Interacción	1,959	0,135	0,140	0,935	9,492	<0,0001
ALH	Tratamiento	10,003	0,003	33,020	<0,0001	39,547	<0,0001
	Tiempo	0,492	0,690	2,510	0,070	21,088	<0,0001
	Interacción	6,660	0,001	0,341	0,796	5,557	0,003
BCF	Tratamiento	26,949	<0,0001	1,918	0,172	0,225	0,638
	Tiempo	0,831	0,484	17,848	<0,0001	9,697	<0,0001
	Interacción	0,665	0,578	0,596	0,620	16,935	<0,0001
Contenido de ATP	Tratamiento	2,630	0,116	11,309	0,002	10,243	0,003
	Tiempo	13,823	<0,0001	36,281	<0,0001	1,252	0,306
	Interacción	0,456	0,715	6,299	0,001	1,802	0,165
Capacitación	Tratamiento	94,367	<0,0001	112,084	<0,0001	88,798	<0,0001
	Tiempo	1,713	0,187	13,238	<0,0001	2,769	0,060
	Interacción	1,223	0,320	9,270	<0,0001	3,772	0,022
Hiperactivación	Tratamiento	12,580	0,001	36,478	<0,0001	56,084	<0,0001
	Tiempo	7,864	<0,0001	1,304	0,272	10,314	<0,0001
	Interacción	7,462	0,000	0,103	0,958	13,293	<0,0001

Tabla 6. Correlación de Pearson entre el porcentaje de capacitación y el porcentaje de espermatozoides hiperactivados en condiciones capacitantes (mT-BH) para tres especies de ratón (*M. musculus*, *M. spretus* y *M. spicilegus*). Los resultados resaltados en negrita indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en el análisis estadístico.

	r_{xy}	p
<i>Mus musculus</i>	0,99	0,0084
<i>Mus spretus</i>	-0,04	0,8399
<i>Mus spicilegus</i>	0,42	0,0426

Tabla 7. Efectos del estado de los espermatozoides (no hiperactivado o hiperactivado) y del tiempo sobre diferentes parámetros de cinética espermática (VCL, VSL, LIN, ALH y BCF) en tres especies de ratón (*M. musculus*, *M. spretus* y *M. spicilegus*) bajo condiciones capacitantes (incubación en medio mT-BH). Los valores de *F* y *p* corresponden a ANOVA de medidas repetidas, utilizando a los individuos como factor aleatorio y el estado de los espermatozoides y el tiempo como factores fijos. Los resultados resaltados en negrita indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en el análisis estadístico.

		<i>Mus musculus</i>		<i>Mus spretus</i>		<i>Mus spicilegus</i>	
		<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
VCL	Estado	215,217	<0,0001	59,995	<0,0001	1,507	0,223
	Tiempo	1,856	0,142	0,921	0,443	5,030	0,003
	Interacción	0,376	0,771	0,773	0,511	5,361	0,002
VSL	Estado	3,589	0,061	37,789	<0,0001	111,676	<0,0001
	Tiempo	9,063	<0,0001	8,13	<0,0001	16,04	<0,0001
	Interacción	0,279	0,841	0,303	0,823	0,771	0,513
LIN	Estado	20,994	<0,0001	125,778	<0,0001	179,422	<0,0001
	Tiempo	13,285	<0,0001	17,541	<0,0001	17,741	<0,0001
	Interacción	0,15	0,929	0,519	0,670	0,603	0,698
ALH	Estado	2409,089	<0,0001	2132,668	<0,0001	2254,932	<0,0001
	Tiempo	1,792	0,154	5,758	0,001	30,844	<0,0001
	Interacción	0,726	0,539	6,662	<0,0001	0,129	0,943
BCF	Estado	8,341	0,005	63,394	<0,0001	215,774	<0,0001
	Tiempo	0,168	0,917	37,874	<0,0001	4,18	0,008
	Interacción	0,268	0,849	0,018	0,997	1,772	0,128

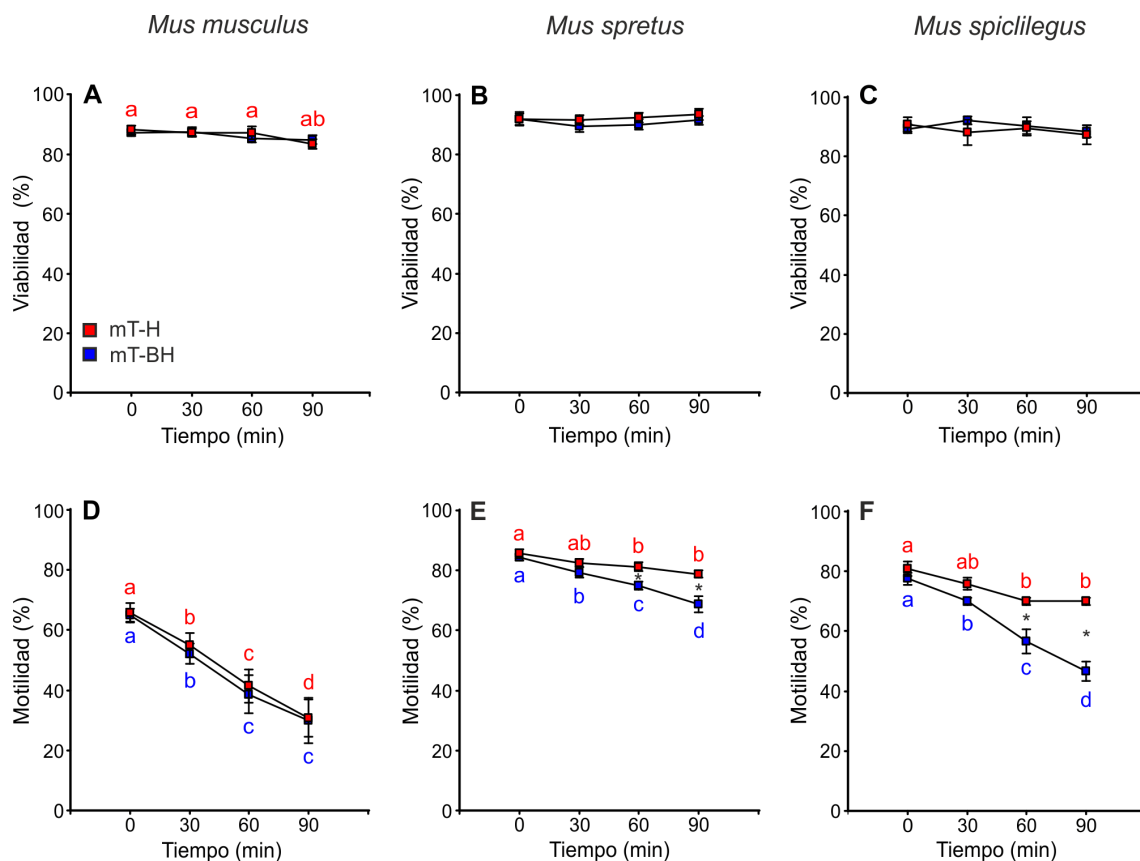


Figura 12. Variación de los parámetros espermáticos (viabilidad y porcentaje de espermatozoides móviles) de tres especies de ratones, a lo largo del tiempo, incubados bajo condiciones de supervivencia (mT-H) o en condiciones de capacitación (mT-BH). Los datos son medias \pm SE ($n = 7$ en *M. musculus*, $n = 8$ en *M. spretus* y $n = 6$ en *M. spicilegus*). Cuadrados rojos: condiciones de supervivencia (mT-H). Cuadrados azules: condiciones de capacitación (mT-BH). A-C: porcentaje de espermatozoides viables. D-F: porcentaje de espermatozoides móviles. *M. musculus* (A, D), *M. spretus* (B, E) y *M. spicilegus* (C, F). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo tiempo con un análisis estadístico post hoc de Fisher. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos para el mismo tratamiento con un análisis estadístico post hoc de Fisher.

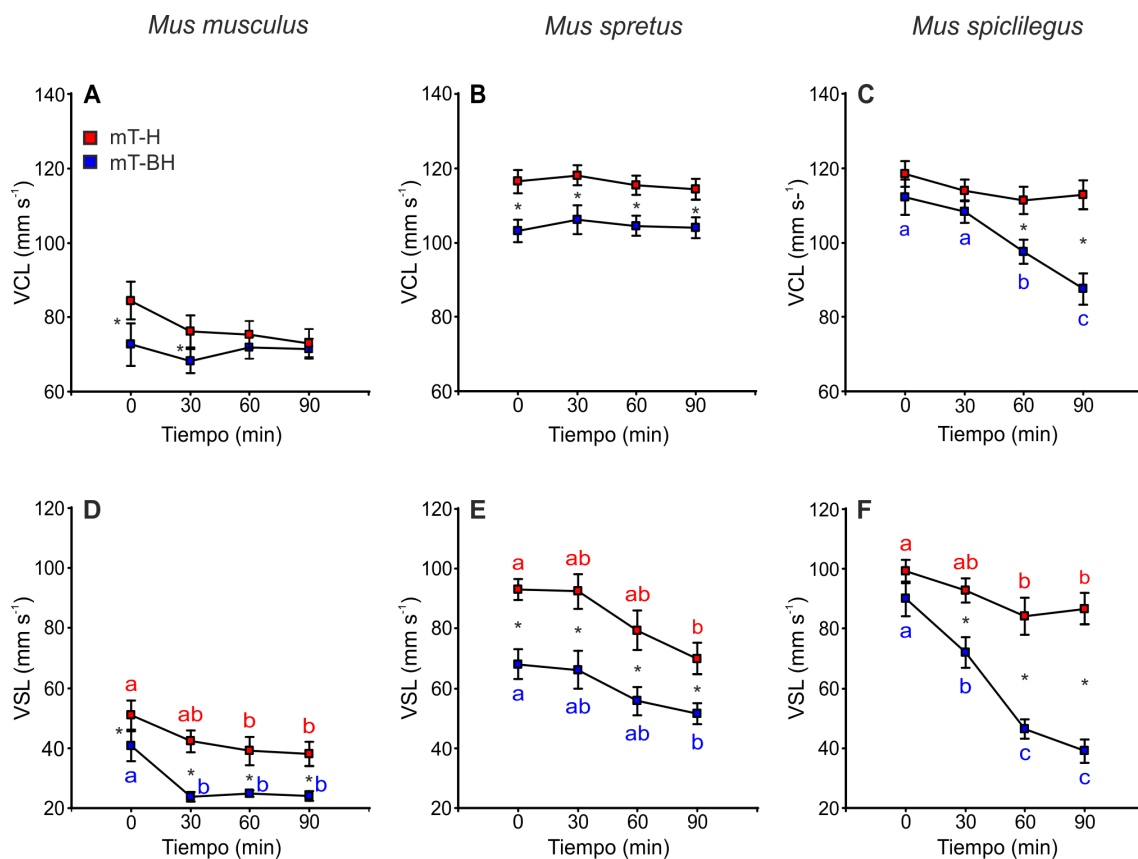


Figura 13. Variación en parámetros de natación (VCL, VSL) de los espermatozoides de tres especies de ratones a lo largo del tiempo, incubados en condiciones de supervivencia (mT-H) y en condiciones de capacitación (mT-BH). Los datos son medias \pm SE ($n = 7$ en *M. musculus*, $n = 8$ en *M. spretus* y $n = 6$ en *M. spicilegus*). Cuadrados rojos: condiciones de supervivencia (mT-H). Cuadrados azules: condiciones de capacitación (mT-BH). A-C: Velocidad curvilínea (VCL) ($\mu\text{m s}^{-1}$). D-F: Velocidad rectilínea (VSL) ($\mu\text{m s}^{-1}$). *M. musculus* (A, D), *M. spretus* (B, E) y *M. spicilegus* (C, F). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo tiempo con un análisis estadístico post hoc de Fisher. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos para el mismo tratamiento con un análisis estadístico post hoc de Fisher.

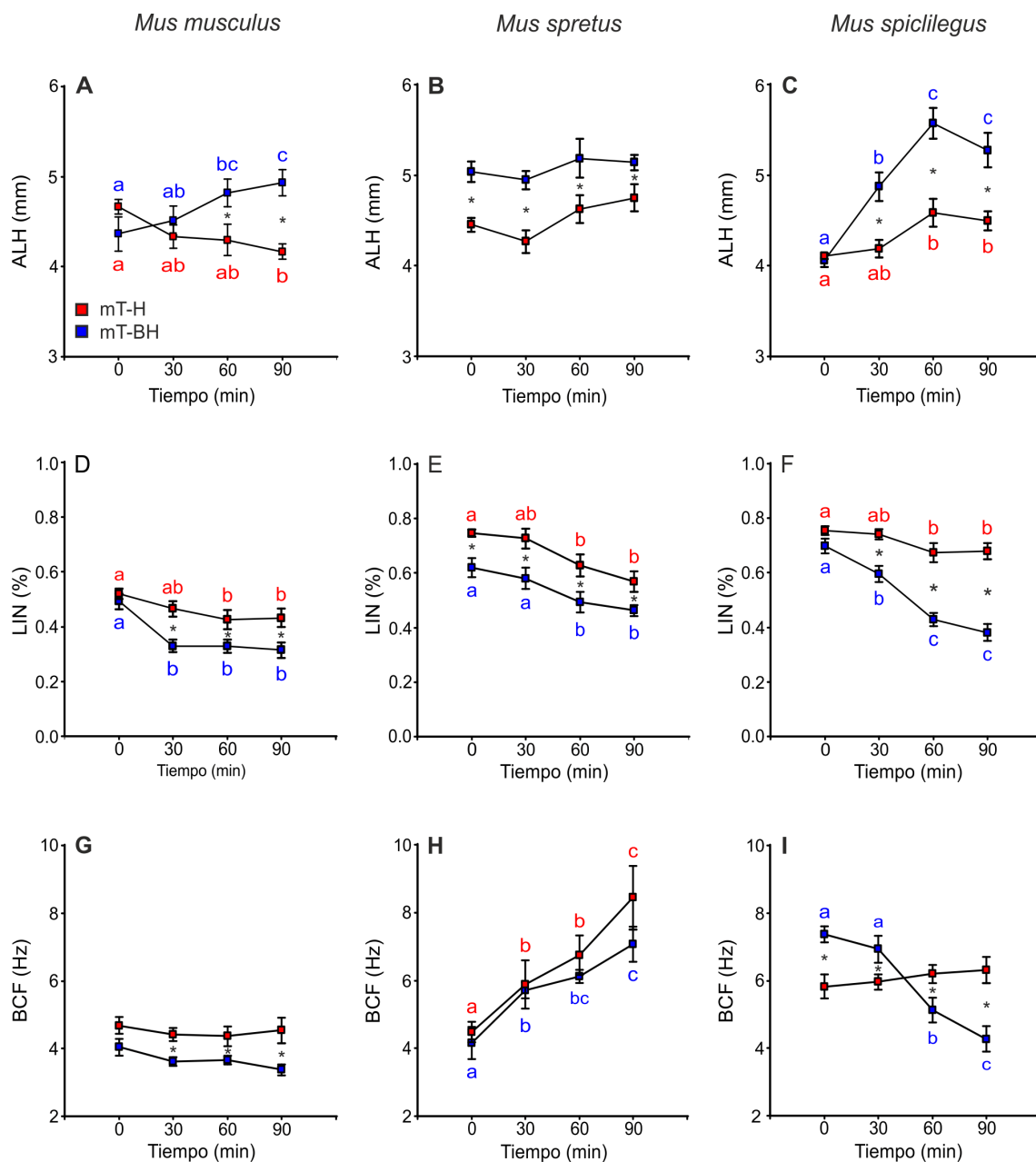


Figura 14. Variación en parámetros de natación (ALH, LIN, BCF) de los espermatozoides de tres especies de ratones a lo largo del tiempo, incubados en condiciones de supervivencia (mT-H) y condiciones de capacitación (mT-BH). Los datos son medias \pm SE ($n = 7$ en *M. musculus*, $n = 8$ en *M. spretus* y $n = 6$ en *M. spicilegus*). Cuadrados rojos: condiciones de supervivencia (mT-H). Cuadrados azules: condiciones de capacitación (mT-BH). A-C: Desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) (μm). D-F: Linearidad (LIN) (VCL/VSL) (%). G-H: Frecuencia del batido flagelar (BCF) (Hz). *M. musculus* (A, D, G), *M. spretus* (B, E, H) y *M. spicilegus* (C, F, I). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo tiempo con un análisis estadístico post hoc de Fisher. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos para el mismo tratamiento con un análisis estadístico post hoc de Fisher.

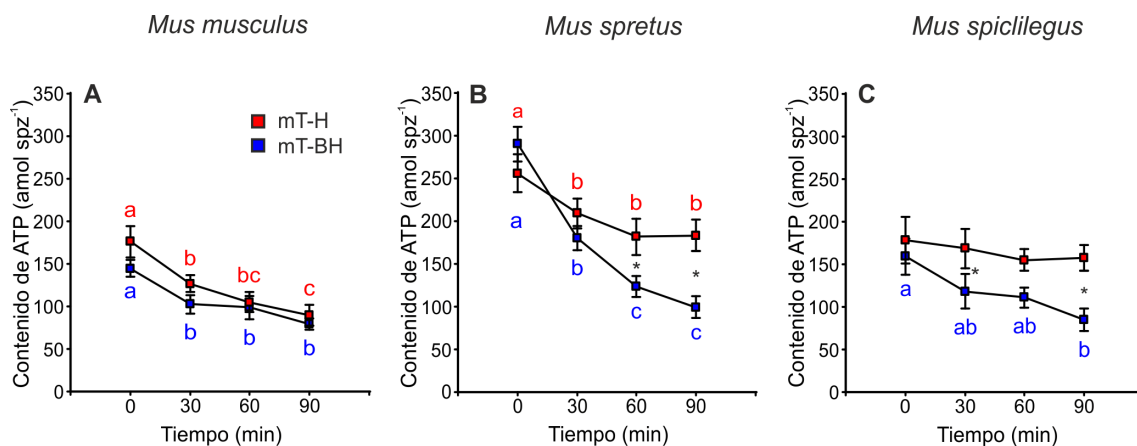


Figura 15. Variación de los niveles de ATP en espermatozoides de tres especies de ratones a lo largo del tiempo, incubados en condiciones de supervivencia (mT-H) y condiciones de capacitación (mT-BH). Los datos son medias \pm SE ($n = 7$ en *M. musculus*, $n = 8$ en *M. spretus* y $n = 6$ en *M. spicilegus*). Cuadrados rojos: condiciones de supervivencia (mT-H). Cuadrados azules: condiciones de capacitación (mT-BH). A-C: Contenido de ATP por espermatozoides (amol spz⁻¹). *M. musculus* (A), *M. spretus* (B) y *M. spicilegus* (C). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo tiempo con un análisis estadístico post hoc de Fisher. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos para el mismo tratamiento con un análisis estadístico post hoc de Fisher.

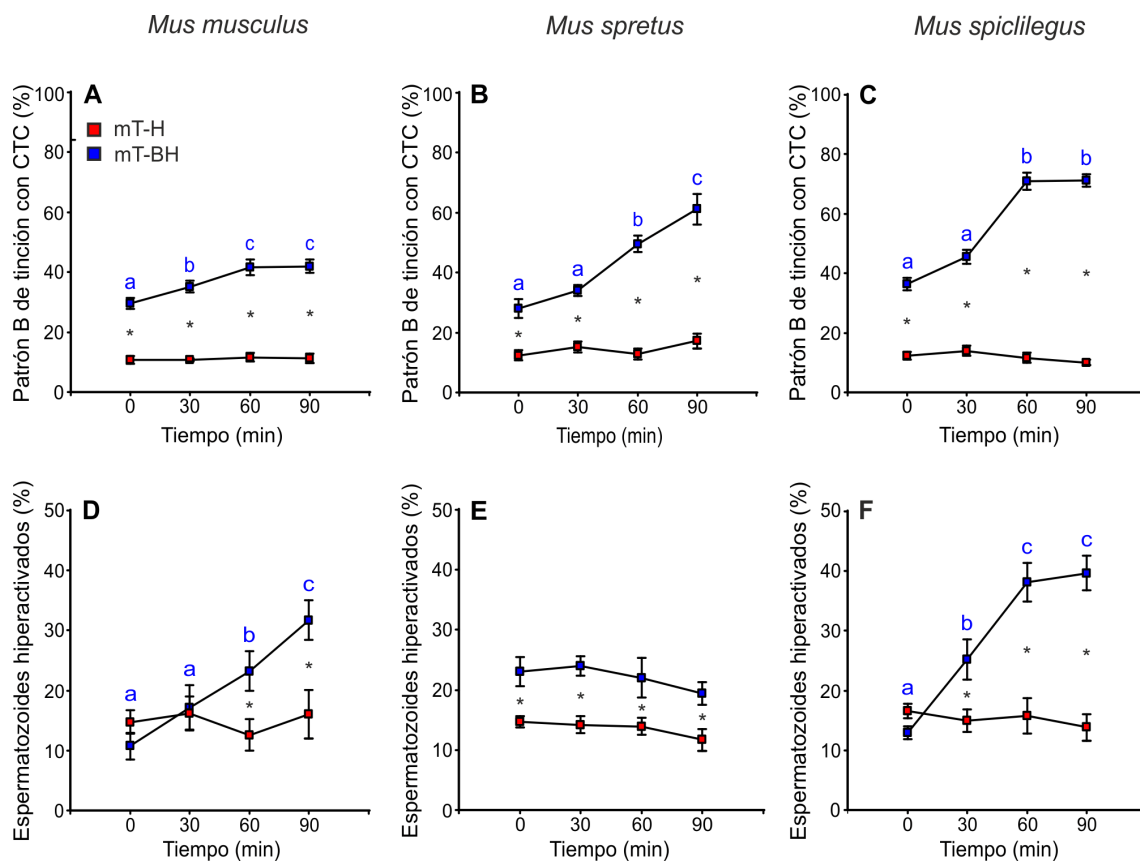


Figura 16. Variación en el porcentaje de espermatozoides capacitados (patrón B de tinción con clortetraciclina, CTC) y en el porcentaje de espermatozoides hiperactivados en tres especies de ratones a lo largo del tiempo, incubados en condiciones de supervivencia (mT-H) y condiciones de supervivencia (mT-BH). Los datos son medias \pm SE ($n = 7$ en *M. musculus*, $n = 8$ en *M. spretus* y $n = 6$ en *M. spicilegus*). Cuadrados rojos: condiciones de supervivencia (mT-H). Cuadrados azules: condiciones de capacitación (mT-BH). A-C: Porcentaje de espermatozoides con patrón B en la tinción con CTC. D-F: Porcentaje de espermatozoides hiperactivados. *M. musculus* (A, D), *M. spretus* (B, E) y *M. spicilegus* (C, F). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo tiempo con un análisis estadístico post hoc de Fisher. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos para el mismo tratamiento con un análisis estadístico post hoc de Fisher.

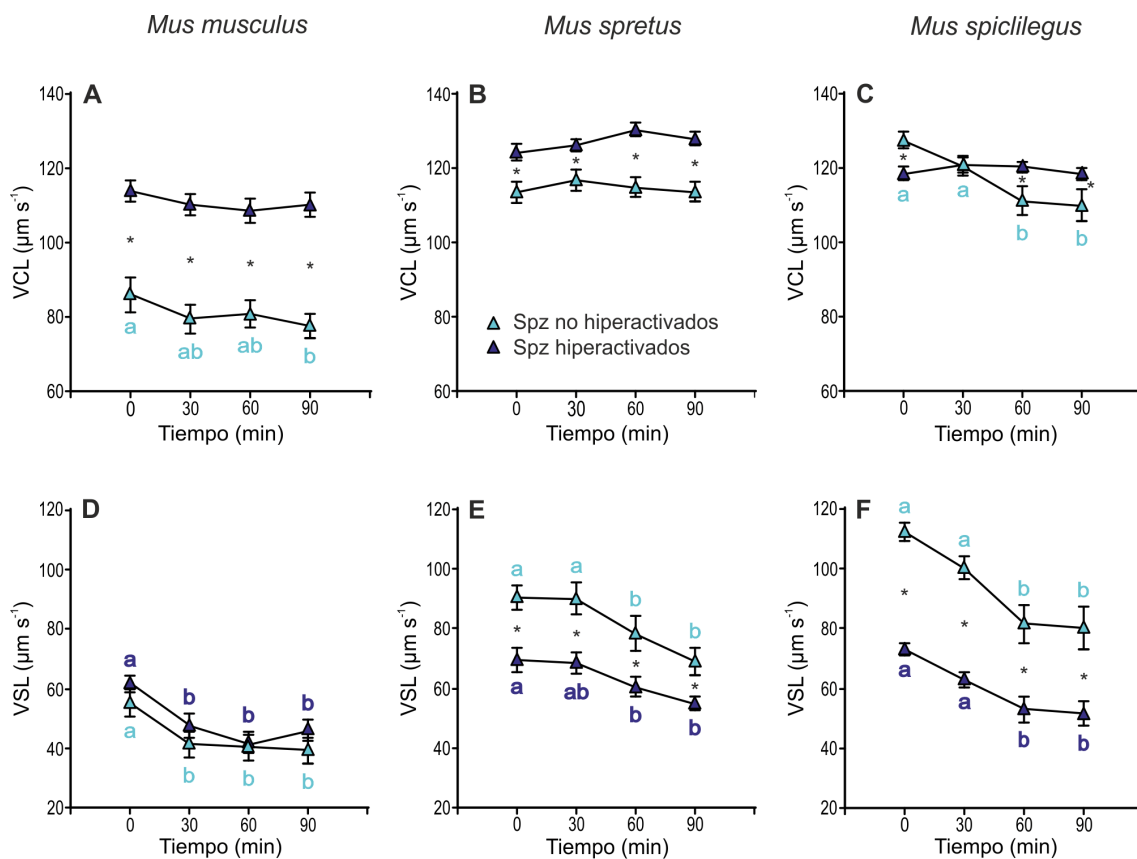


Figura 17. Variación en descriptores de velocidad (VCL, VSL) en espermatozoides hiperactivados y no hiperactivados en tres especies de ratones a lo largo del tiempo, incubados en condiciones capacitantes (mT-BH). Los datos son medias \pm SE ($n = 7$ en *M. musculus*, $n = 8$ en *M. spretus* y $n = 6$ en *M. spicilegus*). Triángulos azules turquesa: espermatozoides no hiperactivados en condiciones de capacitación (mT-BH). Triángulos azul oscuro: espermatozoides hiperactivados en condiciones de capacitación (mT-BH). A-C: Velocidad curvilínea (VCL) ($\mu\text{m s}^{-1}$). D-F: Velocidad rectilínea (VSL) ($\mu\text{m s}^{-1}$). *M. musculus* (A, D), *M. spretus* (B, E) y *M. spicilegus* (C, F). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre espermatozoides no hiperactivados y espermatozoides hiperactivados para el mismo tiempo con un análisis estadístico post hoc de Fisher. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos en espermatozoides no hiperactivados o hiperactivados para el mismo tratamiento con un análisis estadístico post hoc de Fisher.

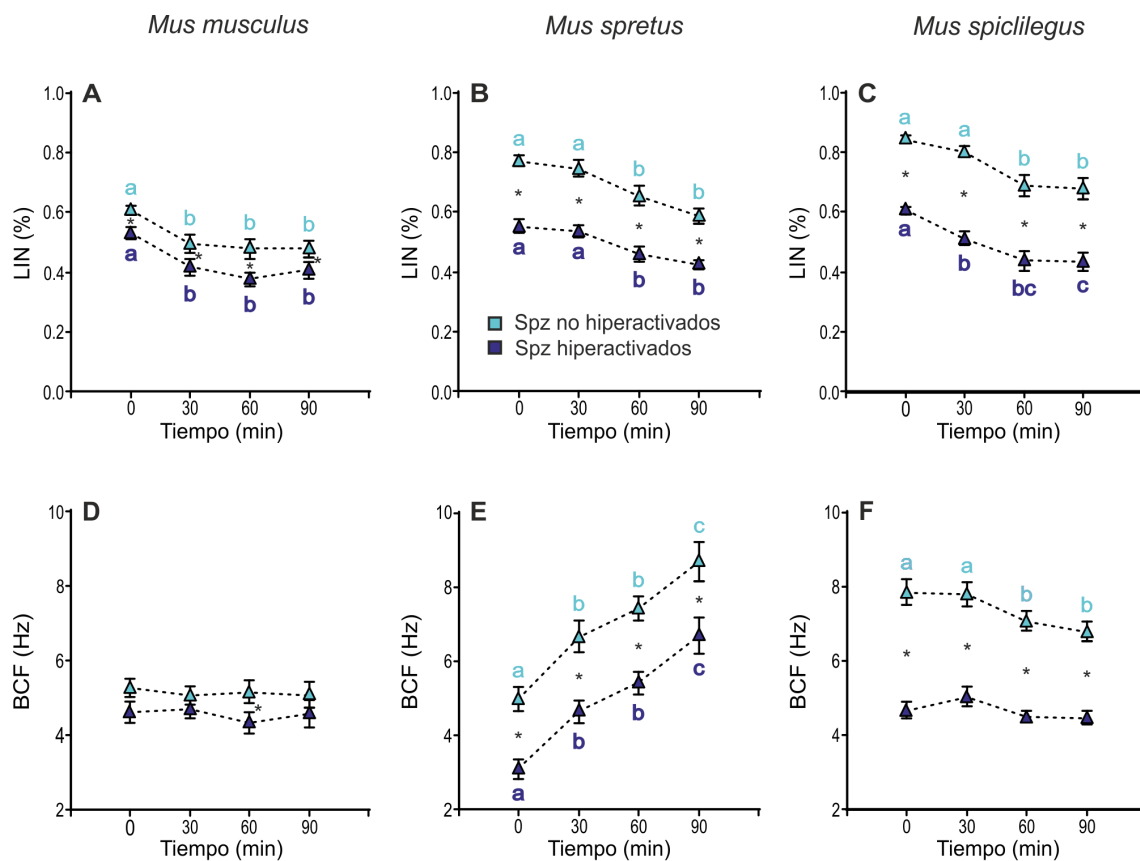


Figura 18. Variación en parámetros de natación (LIN, BCF) de los espermatozoides hiperactivados y no hiperactivados en tres especies a lo largo del tiempo, incubados en condiciones de capacitación (mT-BH). Los datos son medias \pm SE ($n = 7$ en *M. musculus*, $n = 8$ en *M. spretus* y $n = 6$ en *M. spicilegus*). Triángulos azules turquesas: espermatozoides no hiperactivados en condiciones de capacitación (mT-BH). Triángulos azules oscuros: espermatozoides hiperactivados en condiciones de capacitación (mT-BH). A-C: Linearidad (LIN) (VCL/VSL) (%). D-F: Frecuencia de cruce de batido flagelar (Hz). *M. musculus* (A, D), *M. spretus* (B, E) y *M. spicilegus* (C, F). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre espermatozoides no hiperactivados y espermatozoides hiperactivados para el mismo tiempo con un análisis estadístico post hoc de Fisher. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos en espermatozoides no hiperactivados o hiperactivados para el mismo tratamiento con un análisis estadístico post hoc de Fisher.

Serie II

Producción y consumo de ATP en espermatozoides no capacitados y capacitados de *Mus musculus* (B6D2F1). Papel de la glicólisis y fosforilación oxidativa en la generación de energía

Después de preincubar los espermatozoides durante 1 h bajo condiciones de supervivencia o condiciones de capacitación, se evaluó el patrón B de tinción con CTC en células vivas para valorar el porcentaje de capacitación en cada una de las dos condiciones. Se observaron diferencias significativas entre ambas condiciones. En condiciones de capacitación se observó un mayor porcentaje de espermatozoides con patrón B de tinción con CTC ($F = 342,48$, $p = < 0,0001$) (Fig. 19).

Comparación de OCR y ECAR entre diferentes condiciones de incubación

Las medidas de OCR y ECAR de los espermatozoides preincubados en condiciones de supervivencia y capacitación se mantuvieron relativamente estables (Fig. 20A,C). En el caso de OCR, se observaron diferencias significativas entre ambas condiciones: los espermatozoides preincubados en condiciones de supervivencia (mT-H) presentaron valores significativamente mayores de OCR que los espermatozoides preincubados en condiciones de capacitación (mT-BH) (Fig. 20B). En el caso del ECAR, los espermatozoides preincubados en condiciones de supervivencia presentaron valores mayores que los espermatozoides preincubados en condiciones de capacitación (Fig. 20D).

Con la adición de FCCP se observó un aumento significativo del valor de OCR mientras que con la adición de oligomicina o de Antimicina A + Rotenona se apreció una disminución significativa en ambas condiciones de preincubación (Fig. 21A,B). En el caso de las medidas de ECAR, en ambas condiciones de preincubación, el modulador 2DOG produjo una disminución significativa mientras que la oligomicina produjo un aumento significativo con respecto al control (Fig. 21C,D).

El patrón tanto de inhibición como de estimulación del metabolismo en los espermatozoides fue similar en condiciones de supervivencia y en condiciones de capacitación, pero se observaron diferencias a nivel cuantitativo. Los valores de OCR tanto en la inhibición con oligomicina como en la estimulación con FCCP, fueron significativamente mayores en los espermatozoides preincubados en condiciones de supervivencia. Estas diferencias desaparecen cuando se añadió antimicina A + rotenona (Fig. 22A; Tabla 8). En el caso de los valores de ECAR, también se encontraron diferencias significativas entre ambas condiciones de preincubación. En este caso los espermatozoides preincubados en condiciones de capacitación presentaron valores significativamente mayores, tanto en la estimulación con oligomicina como en la inhibición con 2DOG (Fig. 22B; Tabla 8).

Parámetros de OXPPOS y glicólisis

Al comparar los valores de OCR entre los controles y los valores obtenidos al inhibir o estimular la OXPPOS se pudo observar que los espermatozoides preincubados bajo condiciones de supervivencia (mT-H) presentaron valores mayores en todas las tasas relacionadas con la OCR. Estos espermatozoides presentaron una respiración basal significativamente mayor (Fig. 23A; Tabla 9), la cual se tradujo en una producción significativamente mayor de ATP asociada a OXPPOS. En relación con la respiración máxima, estimulada por parte de un desacoplante mitocondrial, como es el caso del FCCP, ésta fue significativamente mayor en los espermatozoides incubados en condiciones de supervivencia (Fig. 23D; Tabla 9). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las condiciones de incubación en relación con la capacidad respiratoria sobrante (Fig. 23E; Tabla 9). Además, los espermatozoides preincubados en mT-H presentaron una fuga de protones significativamente mayor (Fig. 23B,C; Tabla 9).

A partir de los valores de ECAR se obtuvieron parámetros de glicólisis basal y de reserva glicolítica para ambas condiciones de preincubación. En relación con la glicólisis basal, no se observaron diferencias significativas entre condiciones de supervivencia y de capacitación (Fig. 23F; Tabla 9). En el caso de la reserva glicolítica se observó que los espermatozoides incubados bajo condiciones de capacitación presentaron mayor reserva glicolítica. Cuando se inhibió la fosforilación oxidativa con oligomicina, los espermatozoides incrementaron de manera significativa la glicólisis en ambas condiciones, pero el incremento fue significativamente mayor en los espermatozoides capacitados (Fig. 23G; Tabla 9).

Respuesta de OCR a los moduladores del metabolismo. Análisis de OCR en términos porcentuales

El patrón de respuesta del consumo de oxígeno a los moduladores del metabolismo fue similar para ambas condiciones de preincubación, pero a nivel cuantitativo, se encontraron diferencias significativas. Analizando los resultados del porcentaje de OCR sobre el control, se observaron diferencias entre condiciones de supervivencia y condiciones de capacitación. Con la adición de oligomicina, se observó una disminución del 41% del consumo de oxígeno en mT-H (condiciones de supervivencia) y un 33% en mT-BH (condiciones de capacitación). La adición de antimicina A + rotenona ocasionó una nueva disminución del contenido de oxígeno, consumiendo únicamente el 43% en condiciones de supervivencia y el 53% en condiciones de capacitación con respecto al consumo de oxígeno basal (Fig. 24A, C; Tabla 8).

Al añadir FCCP el consumo de oxígeno se incrementó para ambas condiciones de preincubación, pero el incremento fue significativamente mayor en los espermatozoides preincubados en condiciones de capacitación (aproximadamente un 100% con respecto al consumo de los espermatozoides en el control) que en los espermatozoides preincubados en condiciones de supervivencia (aproximadamente un 74% con respecto al control). Al añadir antimicina A + rotenona, el consumo de oxígeno decreció

drásticamente, hasta valores aproximados a los observados en el caso anterior (Fig. 24B,C; Tabla 8).

Respuesta de ECAR a los moduladores del metabolismo. Análisis de ECAR en términos porcentuales

En el caso de la acidificación del medio extracelular se observó que al añadir oligomicina, un inhibidor de OXPHOS, se produjo un aumento de la tasa de acidificación del medio extracelular, respondiendo de una manera significativamente mayor los espermatozoides preincubados en condiciones de capacitación (condiciones de supervivencia: 141%, condiciones de capacitación: 177%) (Fig. 25A,C; Tabla 8). En el caso de 2DOG, un inhibidor de la glicólisis, se produjo un descenso de la tasa de acidificación de aproximadamente 60% para ambas condiciones, sin que se observaran diferencias entre ellas (Fig. 25B,C; Tabla 8).

Tasa de consumo de ATP

Los espermatozoides incubados sin aditivos (control), tanto en condiciones de supervivencia como en condiciones de capacitación, experimentaron una ligera reducción del contenido de ATP a lo largo del tiempo pero que no fue estadísticamente significativa ($F_{1,14} = 3,5765$, $p = 0,07948$). Tampoco se encontraron diferencias entre los controles que fueron incubados en condiciones de supervivencia o en condiciones de capacitación ($F_{1,14} = 0,1709$, $p = 0,6855$).

Los espermatozoides incubados con inhibidores del metabolismo (antimicina A, rotenona, oligomicina y 2-desoxi-D-glucosa), tanto en condiciones de supervivencia (mT-H) como en condiciones de capacitación (mT-BH), presentaron una disminución acusada del contenido de ATP a lo largo del tiempo con respecto a sus respectivos controles (mT-H: $F_{1,34} = 145,16$; $p < 0,0001$; mT-BH: $F_{1,32} = 42$; $p < 0,0001$) (Fig. 26A,B). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas entre condiciones de supervivencia y condiciones de capacitación en presencia de inhibidores ($F_{1,52} = 0,4431$; $p = 0,5086$) (Fig. 26A,B).

Con los valores del contenido de ATP obtenidos para los espermatozoides con su producción de ATP inhibido, se calculó la tasa de consumo de ATP ($\mu\text{mol ATP min}^{-1}$) a través de regresiones no lineales de manera global para cada una de las condiciones de incubación (supervivencia y capacitación). Los resultados mostraron un exponente (pendiente) negativo en ambas condiciones: ecuación de la regresión no lineal en condiciones de supervivencia (mT-H): $Y = 1,19X^{-1,35}$; ecuación de la regresión no lineal en condiciones de capacitación (mT-BH): $Y = 1,06X^{-1,24}$. Los espermatozoides incubados en condiciones de supervivencia presentaron una tasa de consumo de ATP similar a la de los espermatozoides incubados en condiciones de capacitación (Fig. 27; Tabla 10).

Tabla 8. Tasa de acidificación del medio (ECAR) y consumo de oxígeno (OCR) en espermatozoides preincubados en diferentes medios de incubación (mT-H: condiciones de supervivencia y mT-BH: condiciones de capacitación) y entre diferentes tratamientos (OCR: control, oligomicina, FCCP y antimicina + rotenona; ECAR: control, oligomicina y 2DOG). df num: grados de libertad del numerador. df den; grados de libertad del denominador. Los resultados en negrita indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Variable dependiente	Variable independiente	df num	df den	F	p
OCR (amol O ₂ min ⁻¹ spz ⁻¹)	Medio	1	417	41,9654	<0,0001
	Tratamiento	3	418	307,6567	<0,0001
	Interacción	3	417	6,4633	0,0003
% OCR sobre el control	Medio	1	417	46,22	<0,0001
	Tratamiento	3	378	650,57	<0,0001
	Interacción	3	417	10,84	<0,0001
ECAR (npH min ⁻¹ spz ⁻¹)	Medio	1	282	4,0039	0,04635
	Tratamiento	2	284	121,3948	<0,0001
	Interacción	2	282	4,3072	0,01437
% ECAR sobre el control	Medio	1	282	0,0051	0,9433
	Tratamiento	2	176	371,0113	<0,0001
	Interacción	2	282	13,5543	<0,0001

Tabla 9. Tasas obtenidas a partir OCR: respiración basal, producción de ATP, fuga de protones, respiración máxima y capacidad respiratoria sobrante) y tasas obtenidas a partir de ECAR: glicólisis basal y reserva glicolítica. Diferencias entre los medios de incubación (m-TH: condiciones de supervivencia y mT-BH: condiciones de capacitación). df num: grados de libertad del numerador. df den: grados de libertad del denominador. Los resultados en negrita indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Variable dependiente	Variable independiente	df num	df dem	F	p
Respiración basal ($\text{amol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ spz}^{-1}$)	Medio	1	19	8,1245	0,01023
Producción de ATP ($\text{amol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ spz}^{-1}$)	Medio	1	19	6,8925	0,01666
Fuga de protones ($\text{amol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ spz}^{-1}$)	Medio	1	18	7,697	0,01247
Respiración máxima ($\text{amol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ spz}^{-1}$)	Medio	1	17	11,22	0,0037
Capacidad respiratoria sobrante ($\text{amol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ spz}^{-1}$)	Medio	1	19	0,005	0,9444
Glicólisis basal ($\text{npH min}^{-1} \text{ spz}^{-1}$)	Medio	1	18	0,2279	0,6404
Reserva glicolítica ($\text{npH min}^{-1} \text{ spz}^{-1}$)	Medio	1	14	14,83	0,0011

Tabla 10. Tasa de consumo de ATP en los dos medios de incubación (mT-H: condiciones de supervivencia y mT-BH: condiciones de capacitación). Los resultados en negrita indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Medio	Intercepto	pendiente	R² ajustado	F_{2,27}	p
mT-H	1,19	-1,35	0,5373	17,84	<0,0001
mT-BH	1,06	-1,24	0,6088	23,565	<0,0001

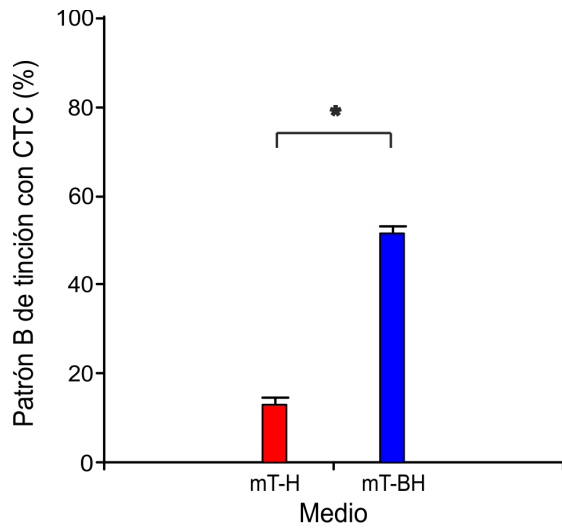


Figura 19. Porcentaje de espermatozoides capacitados (espermatozoides que presentan el patrón B de capacitación con CTC) a los 60 min de incubación en condiciones de supervivencia (mT-H) representado por la barra roja y en condiciones de capacitación (mT-BH) representado por la barra azul. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cada uno de los medios de incubación (mT-H y mT-BH).

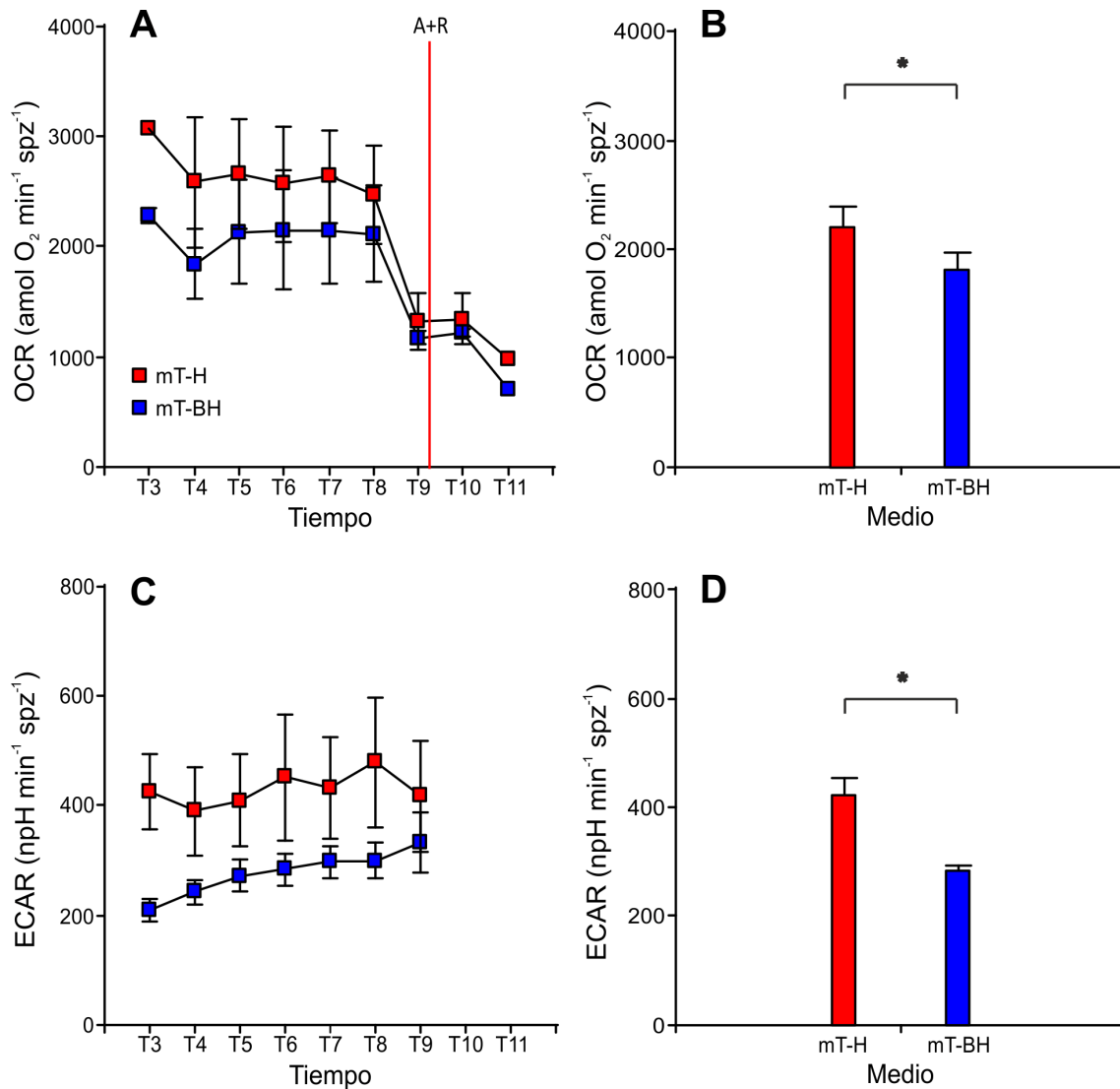


Figura 20. Tasa de consumo de oxígeno (OCR) (A, B) y tasa de acidificación del medio (ECAR) (C, D) en espermatozoides de *M. musculus* B6D2F1 en ambos medios de preincubación: mT-H (condiciones de supervivencia) representado por cuadros y barras rojas y mT-BH (condiciones de capacitación) representado por cuadros y barras azules. (A) Valores control de OCR a lo largo del tiempo en ambos medios de preincubación (mT-H y mT-BH). (B) Valores control de OCR en ambos medios de preincubación (mT-H y mT-BH). (C) Valores control de ECAR a lo largo del tiempo en ambos medios de preincubación (mT-H y mT-BH). (D) Valores control de ECAR en ambos medios de preincubación (mT-H y mT-BH). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cada uno de los medios de preincubación (mT-H y mT-BH).

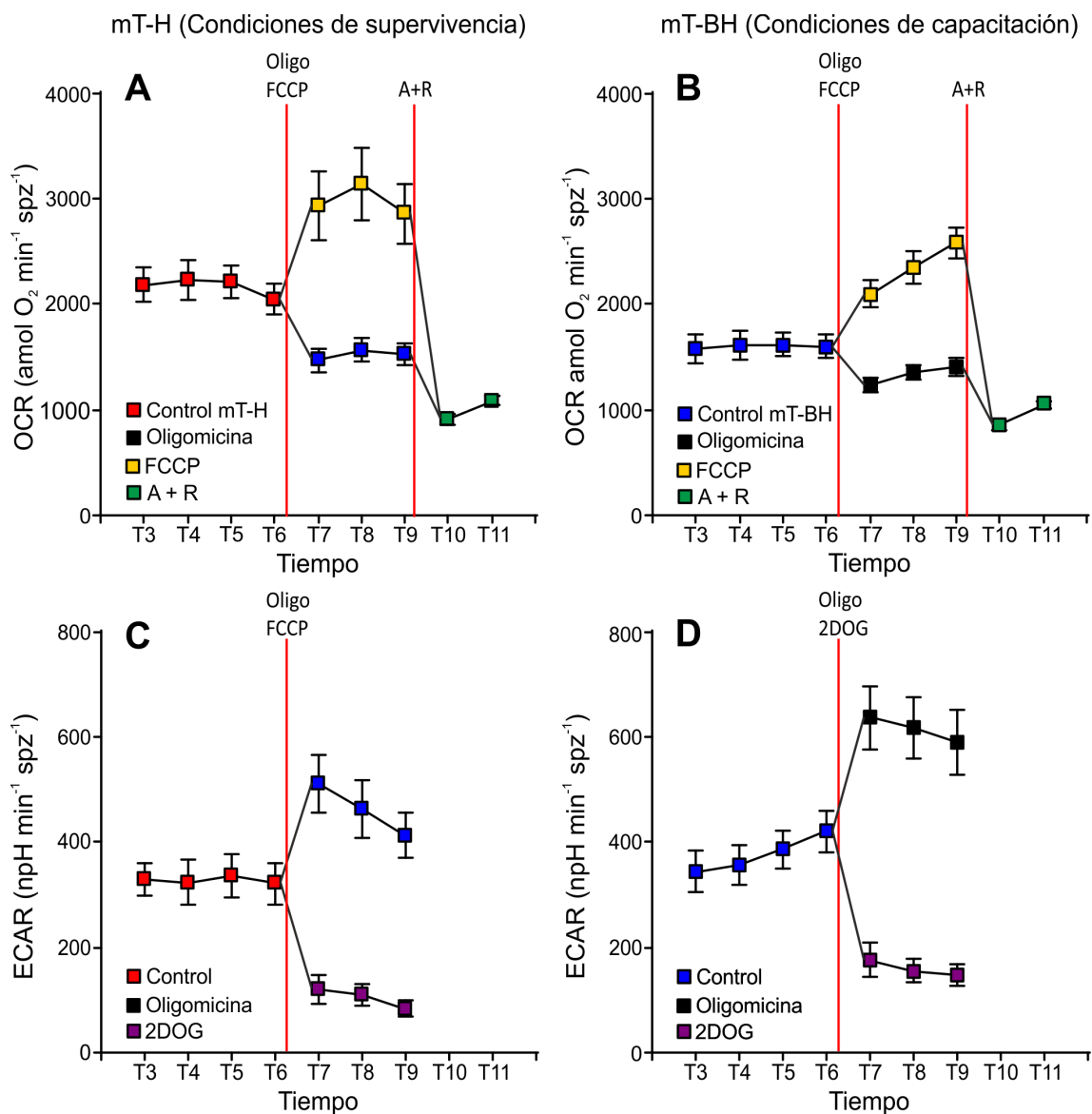


Figura 21. Tasa de consumo de oxígeno (OCR) (A, B) y tasa de acidificación del medio (ECAR) (C, D) en espermatozoides de *M. musculus* B6D2F1 en ambos medios de preincubación: mT-H (condiciones de supervivencia) (A, C) y mT-BH (condiciones de capacitación) (B, D) a lo largo del tiempo. Control mT-H: cuadrados rojos. Control mT-BH: cuadrados azules. Oligomycin (concentración final: 5 μ M): cuadrados negros, FCCP (concentración final: 1 μ M) cuadrados amarillos, 2DOG (concentración final: 50 mM) cuadrados morados, oxamato (concentración final: 30 mM), A+R (concentración final de ambos: 1 μ M): cuadrados verdes.

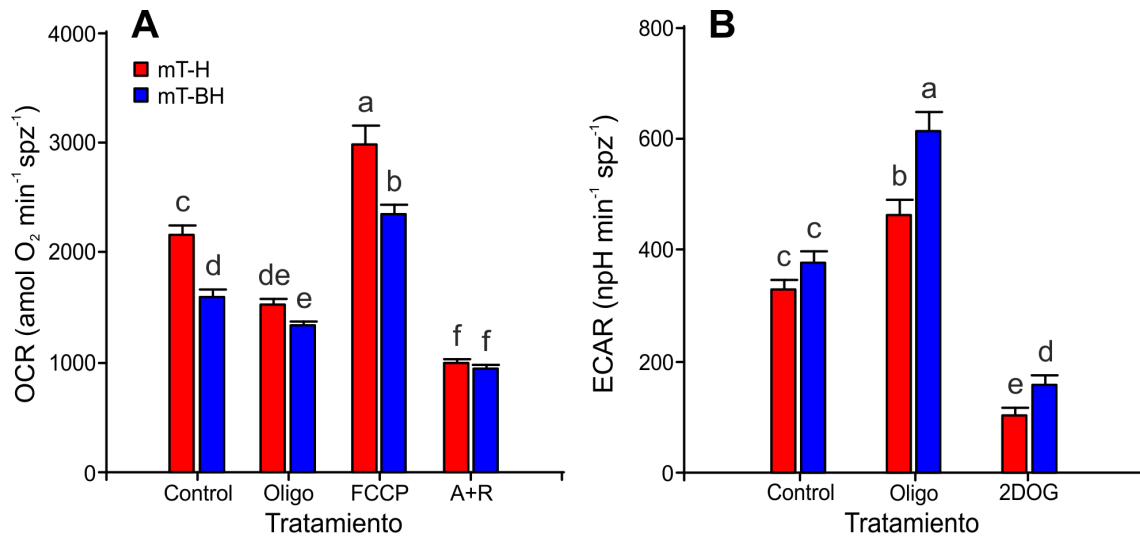


Figura 22. Tasa de consumo de oxígeno (OCR) (A) y tasa de acidificación del medio (ECAR) (B) en espermatozoides de *M. musculus* B6D2F1 en ambos medios de preincubación (mT-H: condiciones de supervivencia y mT-BH: condiciones de capacitación) en cada uno de los tratamientos (OCR: control, oligo (concentración final: 5 μ M), FCCP (concentración final: 1 μ M) y A + R (concentración final de ambos: 1 μ M). ECAR: control, oligo (concentración final: 5 μ M) y 2DOG (concentración final: 50 mM)). mT-H: barras rojas. mT-BH: barras azules. Las letras representan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medios o tratamientos.

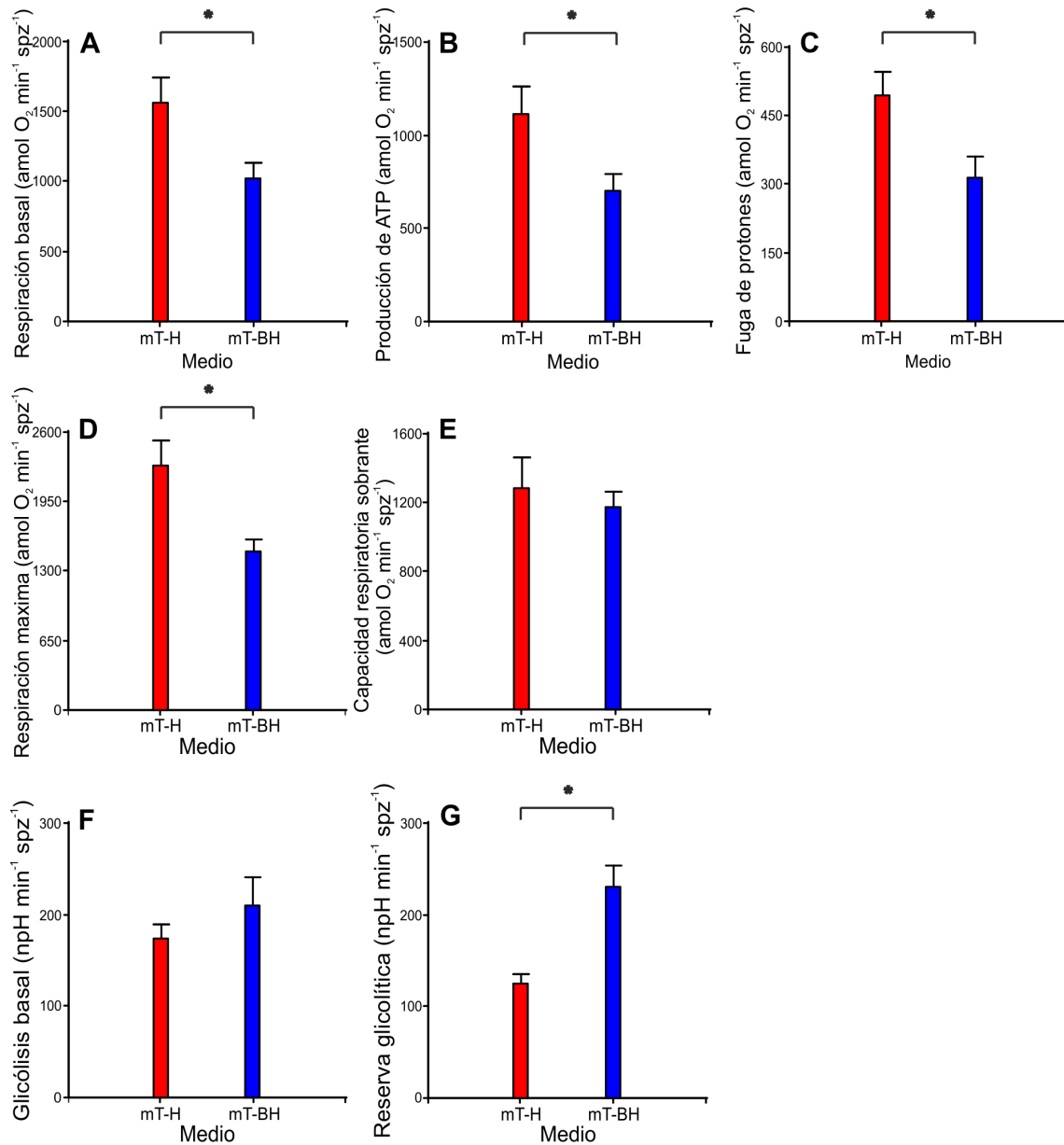


Figura 23. Respiración basal (A), producción de ATP (B), fuga de protones (C), respiración máxima (D), capacidad respiratoria sobrante (E), glicólisis basal (F) y reserva glicolítica (G) en espermatozoides de *M. musculus* B6D2F1 en ambos medios de preincubación (mT-H: condiciones de supervivencia y mT-BH: condiciones de capacitación). mT-H: barras rojas. mT-BH: barras azules. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cada uno de los medios de preincubación (mT-H y mT-BH).

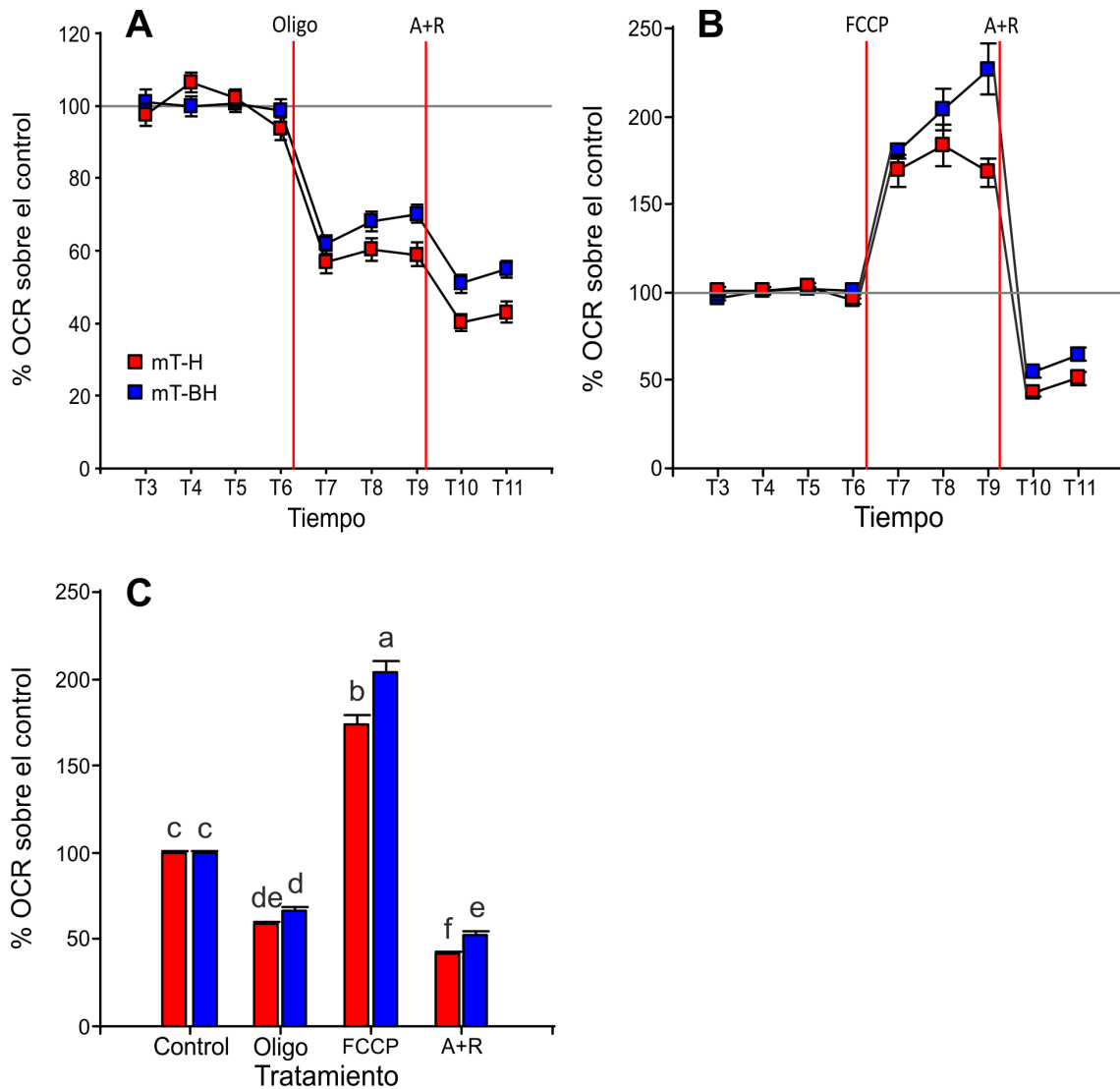


Figura 24. Porcentaje de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) sobre el control en espermatozoides de *M. musculus* B6D2F1 en ambos medios de preincubación (mT-H: condiciones de supervivencia y mT-BH: condiciones de capacitación). (A, B) Porcentaje de OCR sobre el control en ambos medios de preincubación a lo largo del tiempo. mT-H: cuadrados rojos. mT-BH: cuadrados azules. (A) Respuesta de OCR a lo largo del tiempo con la inhibición de la OXPHOS con oligomicina (concentración final: 5 μ M) y seguidamente con A+ R (antimicina A + rotenona ambos a una concentración de 1 μ M). (B) Respuesta de OCR a lo largo del tiempo con la estimulación de OXPHOS con FCCP (concentración final: 1 μ M) y seguidamente inhibida con A+ R (antimicina A + rotenona ambos a una concentración de 1 μ M). (C) Porcentaje de OCR sobre el control en ambos medios de preincubación (mT-H y mT-BH) en cada uno de los tratamientos: control, oligo (concentración final: 5 μ M), FCCP (concentración final: 1 μ M) y A+R (ambas a una concentración final de 1 μ M). mT-H: barras rojas. mT-BH: barras azules. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medios y tratamientos.

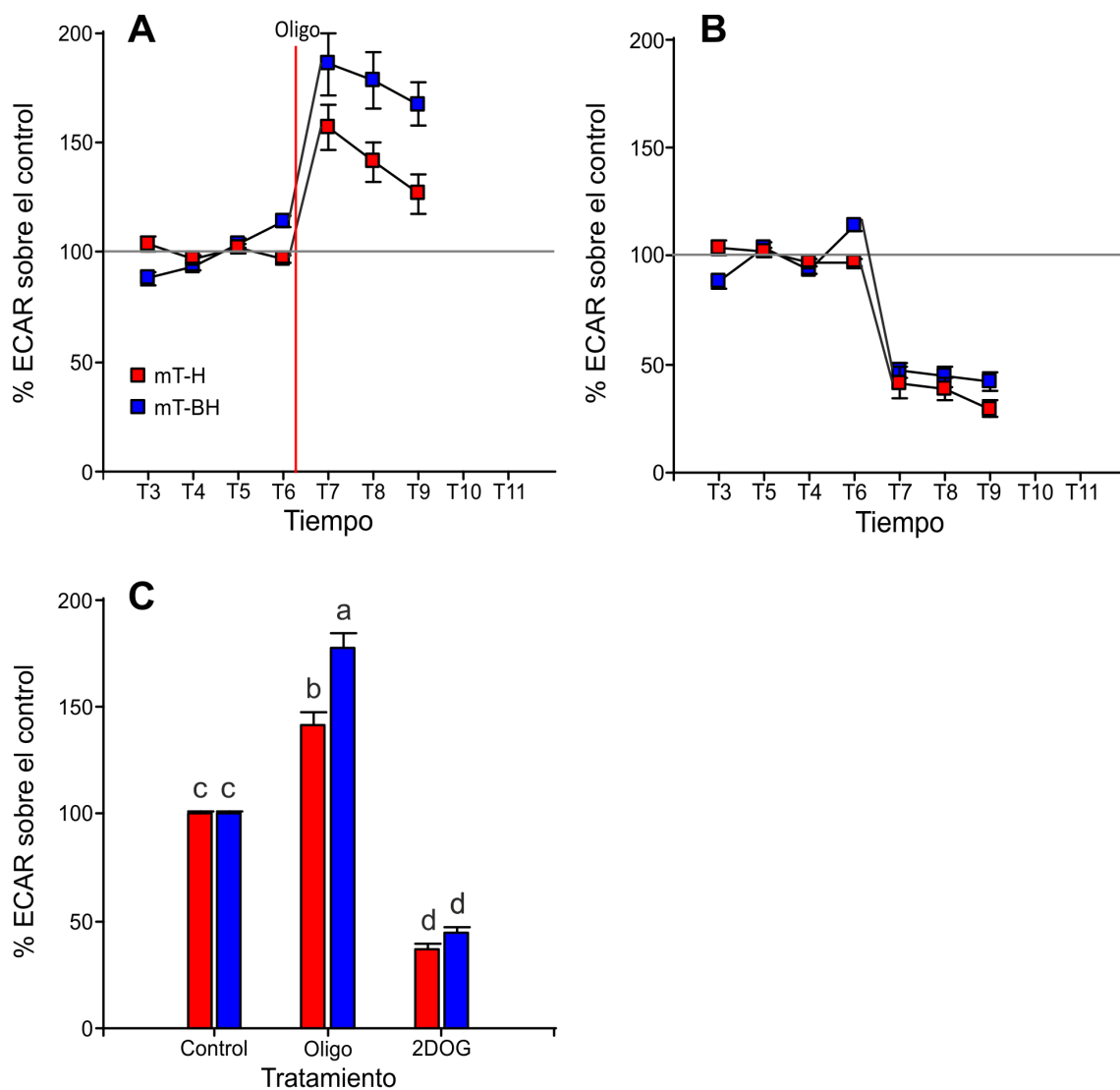


Figura 25. Porcentaje de la acidificación del medio (ECAR) sobre el control en espermatozoides de *M. musculus* B6D2F1 en ambos medios de preincubación (mT-H: condiciones de supervivencia y mT-BH: condiciones de capacitación). (A, B) Porcentaje de ECAR sobre el control en ambos medios de preincubación a lo largo del tiempo. mT-H: cuadrados rojos. mT-BH: cuadrados azules. (A) Respuesta de ECAR a la inhibición de la OXPHOS con oligomicina (concentración final: 5 μ M). (B) Respuesta de ECAR a la inhibición de la glicólisis con 2DOG (concentración final 50 mM). (C) Porcentaje de ECAR sobre el control en ambos medios de preincubación (mT-H y mT-BH) en cada uno de los tratamientos: control, oligo (concentración final: 5 μ M) y 2DOG (concentración final 50 mM). mT-H: barras rojas. mT-BH: barras azules. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medios y tratamientos.

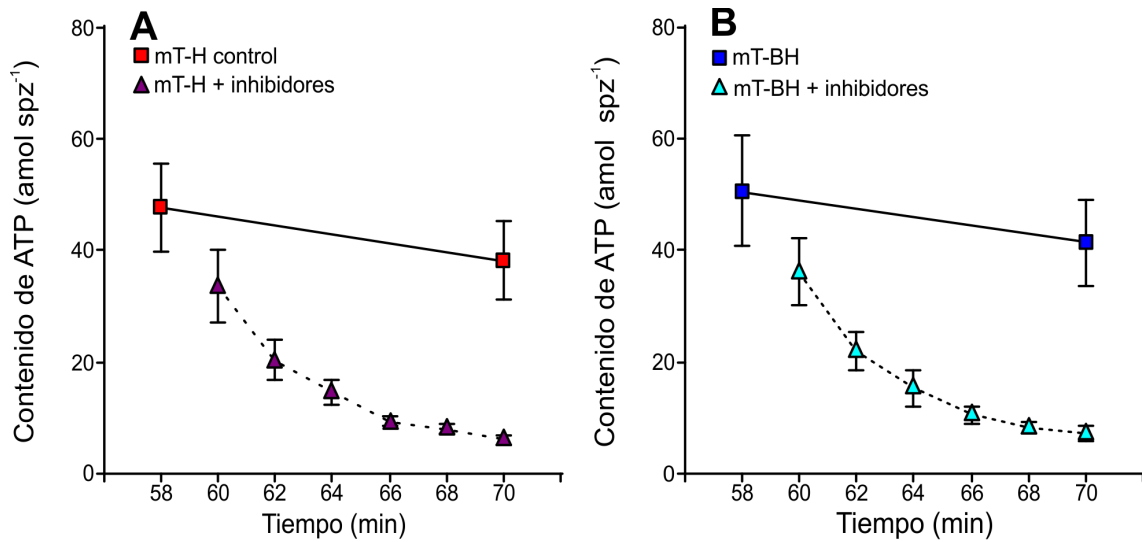


Figura 26. Contenido de ATP en espermatozoides de *M. musculus* B6D2F1 incubados en ambos medios de incubación (mT-H: condiciones de supervivencia y mT-BH: condiciones de capacitación). Variaciones en el contenido de ATP durante 10 min después de 1 h de incubación en distintas condiciones. (A) mT-H (condiciones de supervivencia) Control: cuadrados rojos y línea continua y tratamiento con inhibidores (1 μ M antimicina A, 1 μ M rotenona, 5 μ M oligomicina, 50 mM 2DOG): triángulos morados y línea discontinua. (B) mT-BH (condiciones de capacitación). Control: cuadrados azules oscuros y línea continua y tratamiento con inhibidores (1 μ M Antimicina A, 1 μ M rotenona, 5 μ M oligomicina, 50 mM 2DOG): triángulos azules turquesa y línea discontinua.

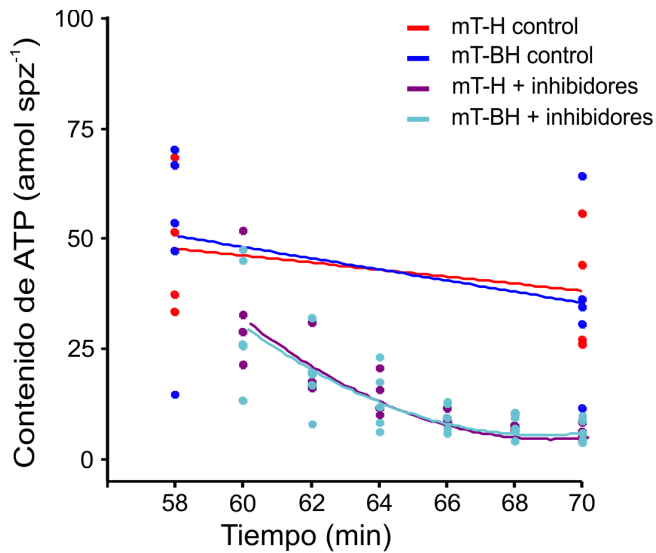


Figura 27. Estimación del consumo de ATP en espermatozoides de *M. musculus* B6D2F1. Control: funciones ajustadas ($Y = a + bX$) al consumo de ATP entre minuto 58 y 70 en ambos medios de incubación (mT-H: condiciones de supervivencia y mT-HB: condiciones de capacitación). Tratamiento con inhibidores ($1\mu\text{M}$ antimicina A, $1\mu\text{M}$ rotenona, $5\mu\text{M}$ oligomicina, 50mM 2DOG): funciones ajustadas ($Y = aX^b$) al consumo de ATP entre minuto 60 y 70 en ambos medios de incubación (mT-H: condiciones de supervivencia y mT-HB: condiciones de capacitación). Control mT-H: círculos rojos y línea de regresión roja. Control mT-BH: círculos azules oscuro y línea de regresión azul oscuro. Tratamiento con inhibidores en mT-H: círculos morados y línea de regresión morada. Tratamiento con inhibidores en mT-BH: círculos azules turquesa y línea de regresión azul turquesa.

Serie III

Producción y consumo de ATP en espermatozoides no capacitados y capacitados de *Mus spicilegus*. Papel de la glicólisis y fosforilación oxidativa en la generación de energía

Comparación de OCR y ECAR entre diferentes condiciones de preincubación

Los espermatozoides de *M. spicilegus* preincubados durante 1 h en diferentes condiciones (supervivencia y capacitación), e incubados durante un período adicional de 1 h en el analizador de flujo extracelular (hasta T7; Fig. 9) mostraron diferencias en el consumo de oxígeno. En la Figura 28A puede observarse que los espermatozoides preincubados en ambas condiciones presentaron valores estables a través del tiempo al ser medidos en condiciones basales. Al añadir A+R el consumo de oxígeno disminuyó para los espermatozoides preincubados en ambas condiciones (Fig. 28A). Observando los resultados absolutos de OCR, se puede observar que los espermatozoides preincubados en condiciones de supervivencia presentan valores significativamente mayores que los espermatozoides preincubados en condiciones de capacitación. (Fig. 28B)

Los valores de ECAR se mantuvieron constantes en ambas condiciones de preincubación (supervivencia y capacitación), con una ligera disminución a lo largo del tiempo (Fig. 28C). En los valores absolutos de ECAR, se observaron diferencias significativas entre ambas condiciones, presentando valores mayores los espermatozoides incubados en condiciones de supervivencia (Fig. 28D)

En la Figura 29A y B se muestran los valores de OCR de espermatozoides que habían sido preincubados previamente en condiciones de supervivencia (medio mT-H, Fig. 29A) y de capacitación (medio mT-BH, Fig. 29B) respectivamente, en respuesta a una serie de inhibidores. Los valores de los controles (sin inhibidores) se mantuvieron estables para espermatozoides preincubados en ambas condiciones. Los valores de OCR al añadir oligomicina experimentan una disminución significativa en ambas condiciones de preincubación (Fig. 30A; Tabla 11). En el caso del desacoplante mitocondrial FCCP se observó un aumento de OCR muy significativo con respecto al control para ambas condiciones de incubación (Fig. 30A; Tabla 11). Al añadir antimicina y rotenona, tanto en el control como en los diferentes tratamientos, se observó una disminución significativa de OCR, tanto para espermatozoides que habían sido preincubados en condiciones de supervivencia como en condiciones de capacitación (Fig. 30A; Tabla 11).

Los patrones de respuesta de los espermatozoides fueron similares, tanto para el control como para los tratamientos con inhibidores, en células espermáticas preincubadas en las dos condiciones, de supervivencia y de capacitación. Sin embargo, a nivel cuantitativo se encontraron diferencias entre las células preincubadas en las dos condiciones. Los

valores de OCR de espermatozoides preincubados en condiciones de supervivencia fueron significativamente mayores tanto en el control como en los espermatozoides tratados con FCCP. Finalmente cuando los espermatozoides de todos los tratamientos fueron expuestos a oligomicina y A+R no se observaron diferencias entre ambas condiciones de preincubación (Fig. 30A; Tabla 11).

Los valores de ECAR de los espermatozoides preincubados en condiciones de supervivencia o de capacitación, y expuestos a los diferentes inhibidores, tanto de glicólisis como de OXPHOS, se ilustran en la Figura 29C,D. Los espermatozoides controles (no tratados), preincubados en condiciones de supervivencia, se mantuvieron estables, mientras que los controles de aquellos preincubados en condiciones de capacitación experimentaron un leve descenso a lo largo del tiempo. Los inhibidores de la glicólisis, oxamato y 2DOG, ocasionaron una disminución significativa del ECAR (Fig. 30B; Tabla 11). En espermatozoides preincubados en condiciones de supervivencia, la exposición a oxamato provocó una disminución de ECAR más pronunciada que la exposición a 2DOG. Por otra parte, en espermatozoides preincubados en condiciones de capacitación, no se observaron diferencias entre espermatozoides tratados con oxamato y 2DOG. (Fig. 30B; Tabla 11). Cuando los espermatozoides se trataron con oligomicina, los valores de ECAR aumentaron significativamente para ambas condiciones de preincubación (Fig. 30B; Tabla 11).

Únicamente se encontraron diferencias entre las condiciones de preincubación en la inhibición con 2DOG, donde los valores de ECAR para espermatozoides preincubados en condiciones de supervivencia fueron mayores que para aquellos preincubados en condiciones de capacitación. No se encontraron diferencias entre los valores de ECAR de las dos condiciones de incubación en los demás tratamientos (Fig. 30B; Tabla 11).

Parámetros de OXPHOS y glicólisis

Con los resultados obtenidos para OCR y ECAR se calcularon varios parámetros asociadas a la OXPHOS y a la glicólisis (Fig. 31, Tabla 12).

Para la OXPHOS se calcularon la respiración basal, la producción de ATP y la fuga de protones. No se encontraron diferencias en estos parámetros para espermatozoides preincubados en las dos condiciones (Fig. 31A-C; Tabla 12). En el caso de la respiración máxima y la capacidad respiratoria sobrante, los espermatozoides preincubados en condiciones de supervivencia presentaron valores mayores a aquellos preincubados en condiciones de capacitación (Fig. 31D, E; Tabla 12).

En el caso de los resultados obtenidos para ECAR, se calcularon la glicólisis basal y la reserva glicolítica. Para la glicólisis basal se encontró que los espermatozoides preincubados en condiciones de capacitación presentaron una glicólisis basal mayor (Fig. 31F; Tabla 12). En el caso de la reserva glicolítica, no se encontraron diferencias significativas entre ambas condiciones de preincubación (Fig. 30G; Tabla 12).

Respuesta de OCR a los moduladores del metabolismo. Análisis de OCR en términos porcentuales

Los resultados se analizaron también ajustándolos en relación a los valores de los controles, tomando como el 100% el valor medio de los tres valores basales en cada una de las condiciones de incubación (Fig. 32). Los espermatozoides preincubados en condiciones de supervivencia y en condiciones de capacitación mostraron un patrón similar de valores de OCR en la respuesta a los moduladores del metabolismo.

El tratamiento con oligomicina ocasionó una disminución del consumo de oxígeno en los espermatozoides preincubados en ambas condiciones frente a los niveles basales (Fig. 32A), pero no se encontraron diferencias entre ambas condiciones de preincubación (Fig. 32C). En el caso de la adición de FCCP, se observó una estimulación de la OXPHOS frente a los valores basales, que ocasionó un mayor consumo de oxígeno en espermatozoides preincubados tanto en condiciones de supervivencia como en condiciones de capacitación (Fig. 32B). Con la adición de FCCP, se encontraron diferencias significativas entre ambas condiciones: los espermatozoides preincubados en condiciones de capacitación presentaron un aumento más pronunciado del consumo de oxígeno (Fig. 32C; Tabla 11). Al añadir A+R a todos los tratamientos en ambas condiciones, supervivencia y capacitación, el consumo de oxígeno cayó drásticamente (Fig. 32A,B), pero no se encontraron diferencias significativas entre ambas condiciones de preincubación (Fig. 32C; Tabla 11).

Respuesta de ECAR a los moduladores del metabolismo. Análisis de ECAR en términos porcentuales

En cuanto a los valores de ECAR ajustados en relación a los valores control (Fig. 33), no se encontraron diferencias entre espermatozoides preincubados en condiciones de supervivencia o capacitación en respuesta a los inhibidores de la glicólisis (Oxamato y 2DOG), tanto a nivel cualitativo, como a nivel cuantitativo.

Se observó una disminución significativa de los valores de ECAR a causa de la adición de dichos inhibidores (Fig. 33B-D). La adición de oligomicina ocasionó un aumento significativo de los valores de ECAR en los espermatozoides preincubados en ambas condiciones. En este caso no se observaron diferencias a nivel cualitativo, pero sí se observaron diferencias a nivel cuantitativo. Los espermatozoides preincubados en condiciones de capacitación respondieron de manera más pronunciada a la oligomicina, ocasionando un aumento de ECAR significativamente mayor que en los espermatozoides incubados en condiciones de supervivencia (Fig. 33A,D).

Tasa de consumo de ATP

Para examinar la tasa de consumo de ATP los espermatozoides se incubaron durante 1 h en condiciones de supervivencia (medio mT-H) o de capacitación (medio mT-BH) y, a continuación, se incubaron durante 10 min adicionales en ausencia o presencia de

inhibidores de glicólisis y OXPHOS. Se obtuvieron muestras a diferentes tiempos a partir de la adición de los inhibidores (o de su solvente como control) para cuantificar las cantidades de ATP, en ausencia de su producción, y así poder estimar su consumo.

Los espermatozoides incubados en condiciones de capacitación, y que no fueron sometidos a tratamiento con inhibidores, presentaron valores significativamente menores en el contenido de ATP que aquellos incubados en condiciones de supervivencia ($F_{1,8} = 23,73$; $p = 0,0012$). En ambos casos, se observó una ligera disminución en el contenido de ATP a lo largo del tiempo, la cual no resultó significativa ($F_{1,8} = 1,5334$; $p = 0,2507$) (Fig. 34A,B).

En el caso de los espermatozoides expuestos a inhibidores de OXPHOS y de glicólisis, con la consiguiente inhibición de la producción de ATP, se observó una disminución muy significativa del contenido de ATP a lo largo del tiempo con respecto a los espermatozoides no expuestos a inhibidores, tanto para los espermatozoides incubados en condiciones de supervivencia como de capacitación (mT-H: $F_{1,20} = 25,125$; $p < 0,0001$; mT-BH: $F_{1,20} = 14,806$; $p = 0,0001$) (Fig. 34A,B).

Una vez que se obtuvieron los valores del contenido de ATP inhibiendo la producción de ATP, se calculó la tasa de consumo de ATP ($\mu\text{mol ATP min}^{-1}$) a través de regresiones no lineales en ambas condiciones de incubación (supervivencia y capacitación). Los resultados mostraron una pendiente negativa a lo largo del tiempo tanto en condiciones de supervivencia como en condiciones de capacitación. La ecuación de la regresión no lineal obtenida en condiciones de supervivencia fue: $Y = 1,47X^{-1,2}$ y en condiciones de capacitación: $Y = 2,02X^{-1,41}$. En estas ecuaciones, el valor del exponente representa la tasa de caída de la curva de regresión. (Fig. 35; Tabla 13).

Tabla 11. Tasa de consumo de oxígeno (OCR) y acidificación del medio (ECAR) en espermatozoides preincubados en diferentes condiciones (mT-H: condiciones de supervivencia o mT-BH: condiciones de capacitación) y entre diferentes tratamientos (para OCR: control, oligomicina, FCCP y antimicina + rotenona; para ECAR: control, oligomicina, oxamato y 2DOG). df num: grados de libertad del numerador. df den; grados de libertad del denominador. Los resultados en negrita indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Variable Dependiente	Variable independiente	df num	df den	F	p
OCR (amol O ₂ min ⁻¹ spz ⁻¹)	Medio	1	769	4,9905	0,0258
	Tratamiento	4	769	533,7073	<0,0001
	Interacción	4	769	2,7815	0,0259
% OCR sobre el control	Medio	1	770	4,8038	0,0287
	Tratamiento	4	772	867,6097	<0,0001
	Interacción	4	769	11,9785	<0,0001
ECAR (npH min ⁻¹ spz ⁻¹)	Medio	1	590	8,7307	0,0032
	Tratamiento	4	590	53,2591	<0,0001
	Interacción	4	590	3,0497	0,0167
% ECAR sobre el control	Medio	1	595	6,411	0,0116
	Tratamiento	4	337	205,2119	<0,0001
	Interacción	4	594	4,0953	0,0028

Tabla 12. Tasas calculadas a partir de valores de consumo de oxígeno (OCR) y de acidificación de medio extracelular (ECAR). Para OCR: respiración basal, producción de ATP, fuga de protones, respiración máxima y capacidad respiratoria sobrante). Para ECAR: glicólisis basal y reserva glicolítica. Los espermatozoides se preincubaron en dos medios, con condiciones diferentes: m-TH, condiciones de supervivencia; mT-BH, condiciones de capacitación. df num: grados de libertad del numerador. df den; grados de libertad del denominador. Los resultados en negrita indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Variable Dependiente	Variable independiente	df num	df dem	F	p
Respiración basal ($\text{amol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ spz}^{-1}$)	Medio	1	26	0,7748	0,3868
Producción de ATP ($\text{amol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ spz}^{-1}$)	Medio	1	14	0,01	0,91
Fuga de protones ($\text{amol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ spz}^{-1}$)	Medio	1	14	1,45	0,25
Fuga de protones ($\text{amol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ spz}^{-1}$)	Medio	1	7	27,48	0,001
Capacidad respiratoria sobrante ($\text{amol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ spz}^{-1}$)	Medio	1	7	32,91	0,0007
Glicólisis basal ($\text{npH min}^{-1} \text{ spz}^{-1}$)	Medio	1	15	16,019	0,001
Reserva glicolítica ($\text{npH min}^{-1} \text{ spz}^{-1}$)	Medio	1	12	0,03	0,87

Tabla 13. Tasa de consumo de ATP en espermatozoides incubados en dos medios y condiciones diferentes: mT-H, condiciones de supervivencia; mT-BH, condiciones de capacitación). Los resultados en negrita indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Medio	Intercepto	pendiente	R² ajustado	F_{2,15}	p
mT-H	1,47	-1,1978	0,8266	41,52	<0,0001
mT-BH	2,02	-1,41	0,9291	112,35	<0,0001

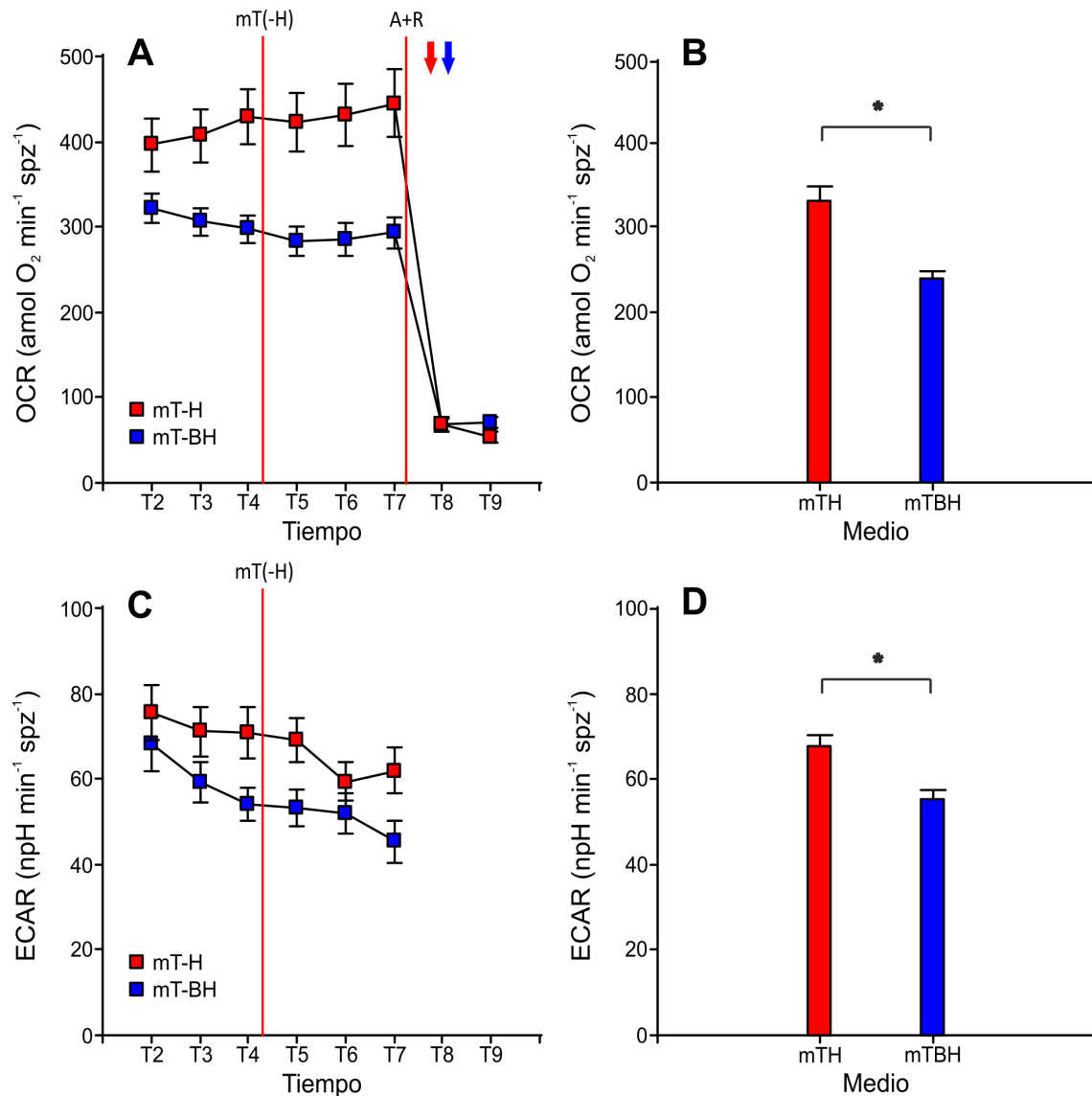


Figura 28. Comparación de las tasas de consumo de oxígeno (OCR) (A, B) y acidificación del medio extracelular (ECAR) (C, D) de espermatozoides de *M. spicilegus* preincubados en dos condiciones diferentes (mT-H: condiciones de supervivencia; mT-BH: condiciones de capacitación) a lo largo del tiempo. (A) Respuesta de los controles a OCR a lo largo del tiempo en ambos medios de preincubación (mT-H, mT-BH). (B) Valores control de OCR en ambos medios de preincubación (mT-H y mT-BH). (C) Respuesta de los controles a ECAR a lo largo del tiempo en ambos medios de preincubación (mT-H y mT-BH). (D) Valores control de OCR en ambos medios de preincubación (mT-H y mT-BH). Los asteriscos indican diferencias significativas entre ambos medios de preincubación ($p < 0,05$). Las flechas indican diferencias significativas a lo largo del tiempo en cada uno de los medios de preincubación ($p < 0,05$) (mT-H: flecha roja. mT-BH: flecha azul).

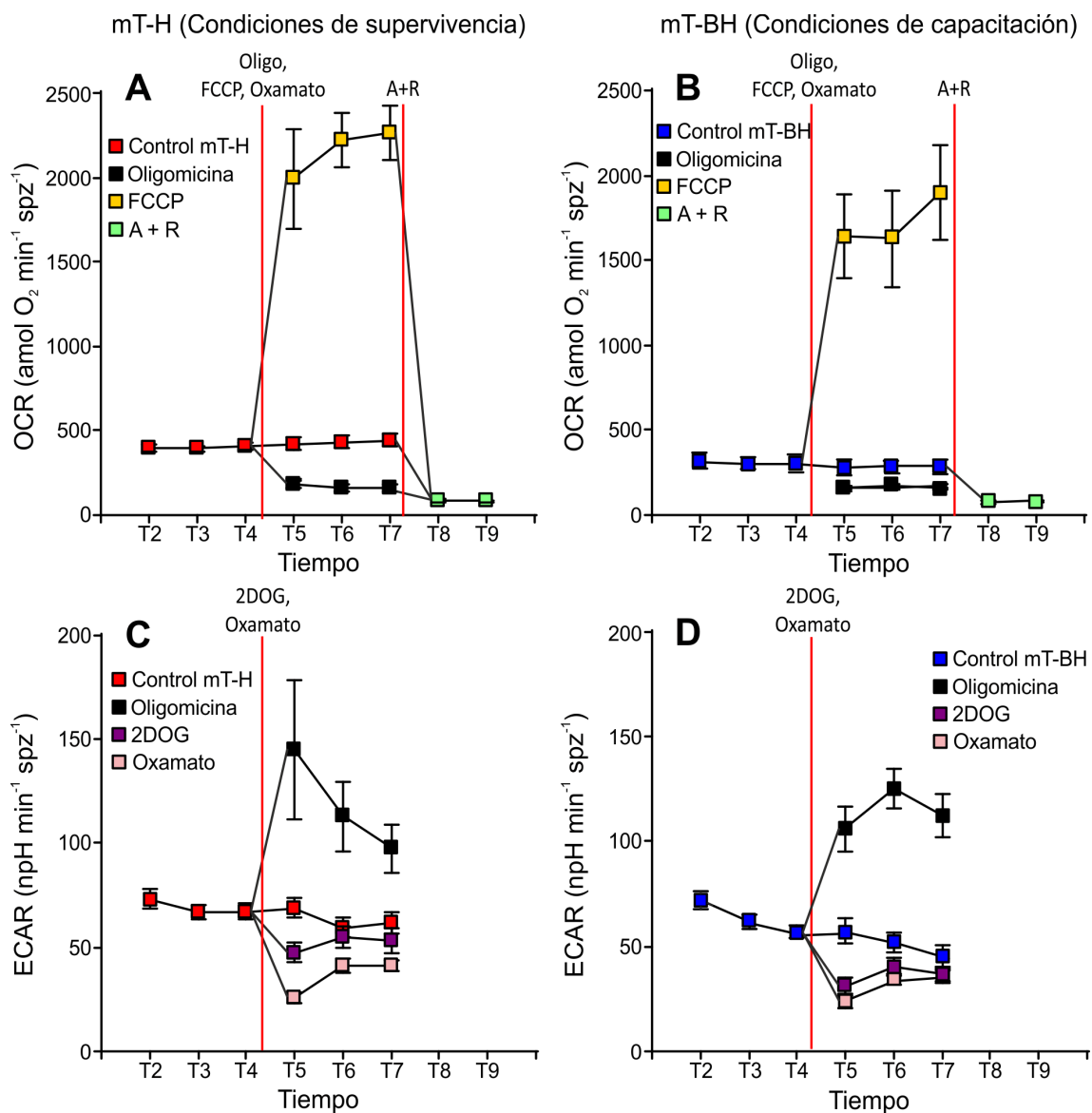


Figura 29. Tasa de consumo de oxígeno (OCR) (A, B) y tasa de acidificación del medio extracelular (ECAR) (C, D) a lo largo del tiempo en espermatozoides de *M. spicilegus* preincubados en medio mT-H (condiciones de supervivencia) representado por cuadrados rojos (A, C), o preincubados en medio mT-BH (condiciones de capacitación) representado por cuadrados azules (B, D). Oligo (concentración final: 5 μ M) representado por cuadrados negros. FCCP (concentración final: 1 μ M) representado por cuadrados amarillos. Ox (concentración final: 30 mM) representado por cuadrados rosas. 2DOG (concentración final: 50 mM) representado por cuadros morados. A+R (concentración final de ambos inhibidores: 1 μ M) representado por cuadrados verdes.

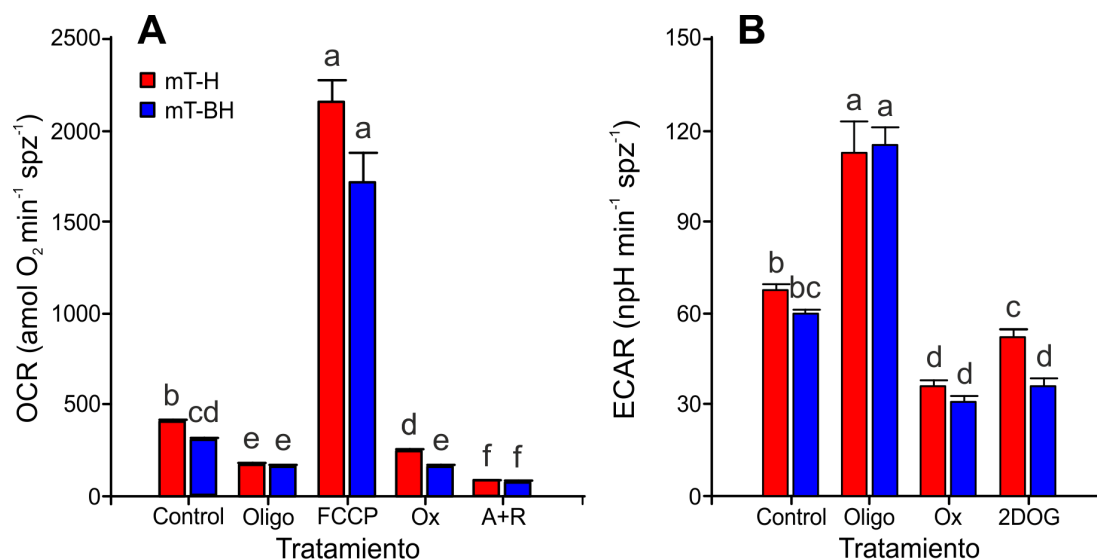


Figura 30. Tasa de consumo de oxígeno (OCR) (A) y tasa de acidificación del medio extracelular (ECAR) (B) en espermatozoides de *M. spicilegus* preincubados en dos condiciones (mT-H: condiciones de supervivencia, y mT-BH: condiciones de capacitación,) y expuestos a diferentes tratamientos. Para OCR: Control, Oligo (concentración final: 5 μ M), FCCP (concentración final: 1 μ M), Ox (concentración final: 30 mM) y A+R (concentración final en ambos inhibidores: 1 μ M). Para ECAR: Control, Oligo (concentración final: 5 μ M), Ox (concentración final: 30 mM) y 2DOG (concentración final: 50 mM). mT-H: barras rojas. mT-BH: barras azules. Las letras representan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medio y tratamientos.

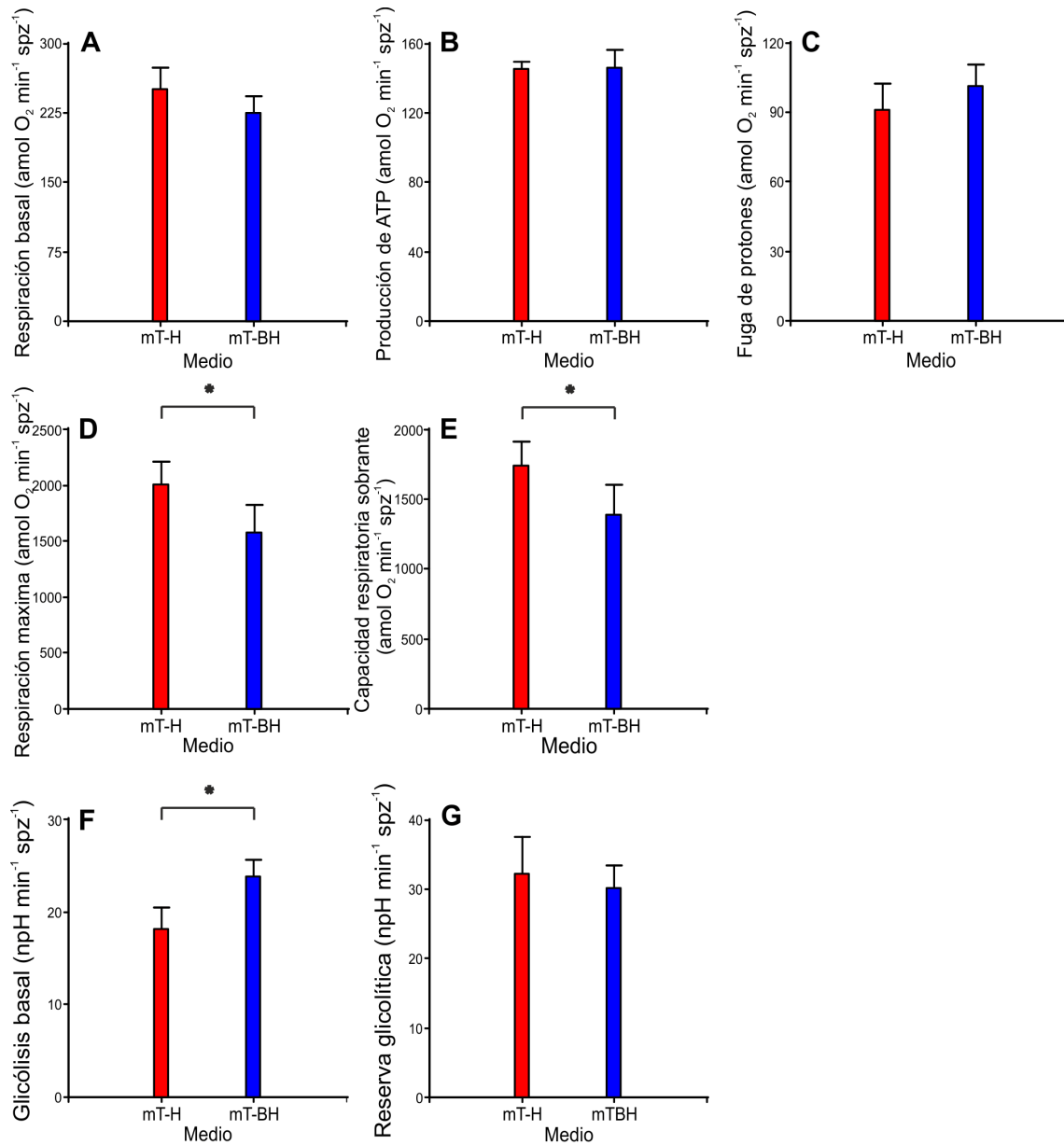


Figura 31. Parámetros derivados de valores de OCR y de ECAR para espermatozoides de *M. spicilegus*. Derivados de OCR: Respiración basal (A), producción de ATP (B), fuga de protones (C), respiración máxima (D), capacidad respiratoria sobrante (E). Derivados de ECAR: glicólisis basal (F) y reserva glicolítica (G). mT-H: barras rojas. mT-BH: barras azules. Los asteriscos indican diferencias significativas entre espermatozoides preincubados en cada uno de los medios de (mT-H y mT-BH) ($p < 0,05$).

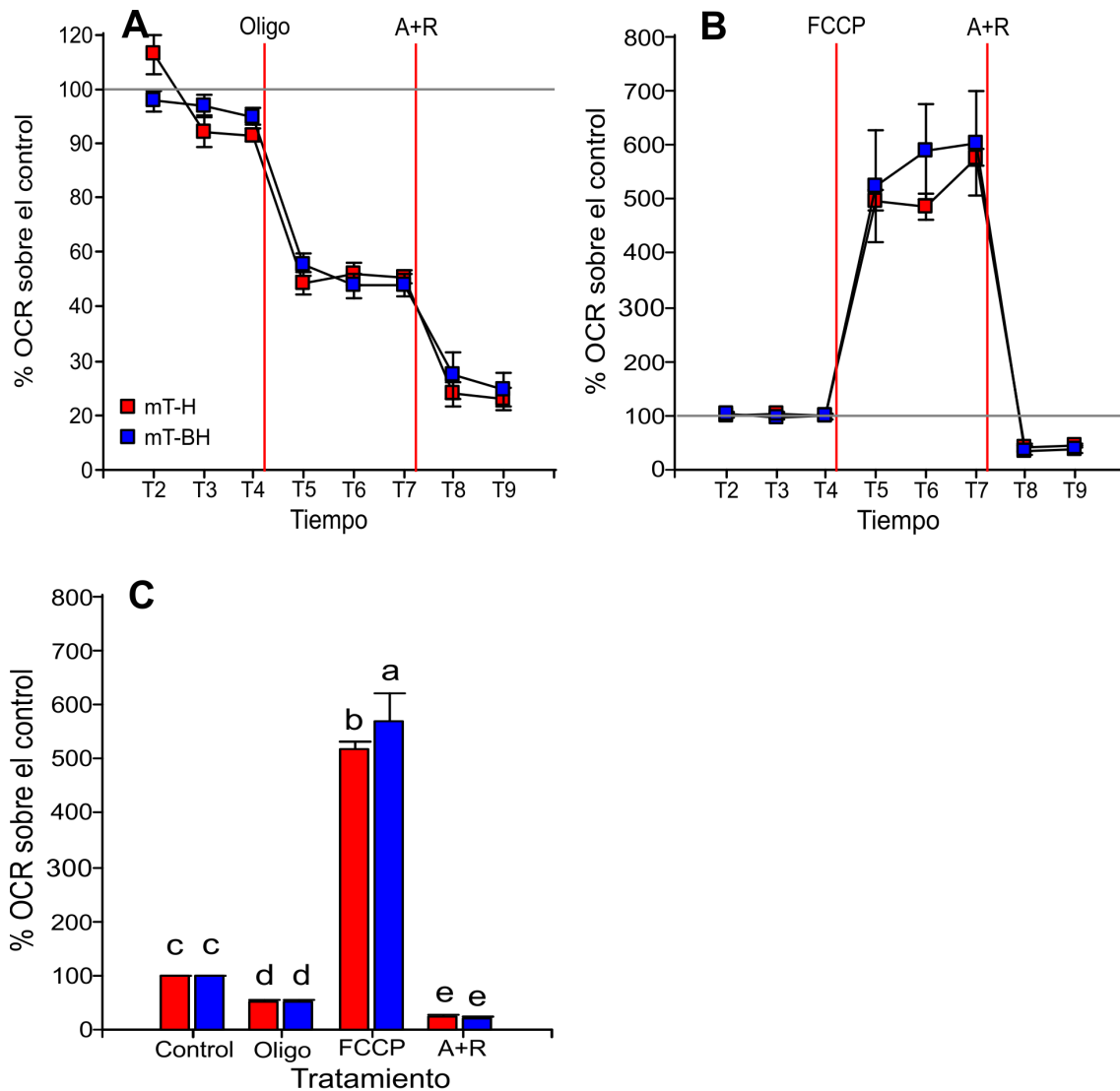


Figura 32. Comparación del porcentaje de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) sobre el control en espermatozoides de *M. spicilegus* sometidos a diferentes moduladores de metabolismo, preincubados en dos condiciones diferentes (mT-H: condiciones de supervivencia (cuadrados y barras rojas); mT-BH: condiciones de capacitación (cuadrados y barras azules) a lo largo del tiempo. (A) Respuesta de OCR a lo largo del tiempo en espermatozoides preincubados en mT- o mT-BH y sometidos a inhibición de la OXPHOS con oligo (concentración final: 5 μ M) y seguidamente con A+R (ambos a una concentración: 1 μ M). (B) Respuesta de OCR a lo largo del tiempo en espermatozoides preincubados en mT-H o mT-BH y sometidos a estimulación de la OXPHOS con FCCP (concentración final: 1 μ M) y seguidamente inhibido con A+R (ambos a una concentración final: 1 μ M). (C) Porcentaje de OCR sobre el control en espermatozoides preincubados en mT-H o mT-BH en cada uno de los tratamientos: control, oligo (concentración final: 5 μ M), FCCP (concentración final: 1 μ M) y A+R (ambos a una concentración final: 1 μ M). Las letras representan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medio y tratamientos.

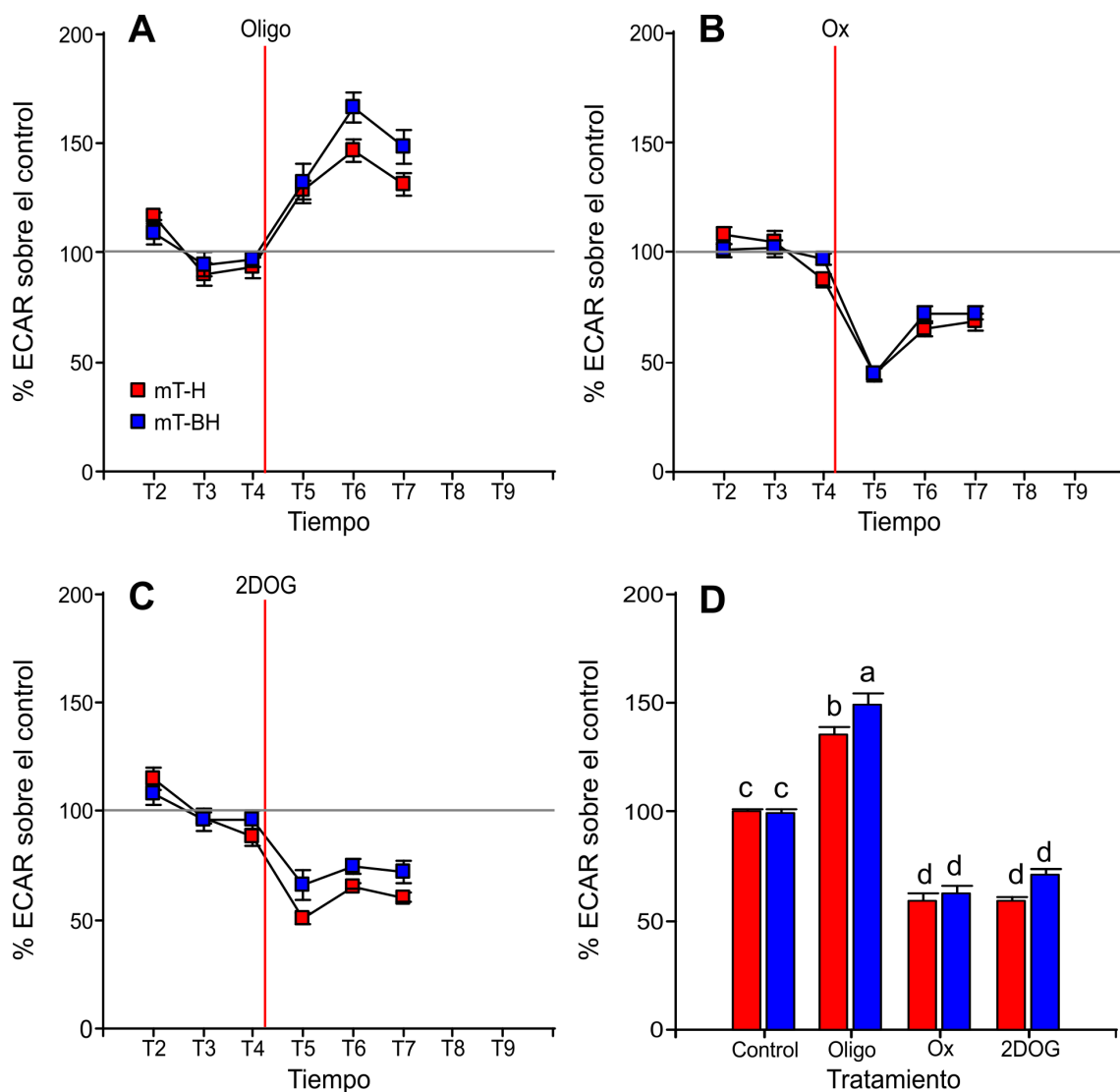


Figura 33. Comparación del porcentaje de la tasa de acidificación del medio extracelular (ECAR) sobre el control en espermatozoides de *M. spicilegus* sometidos a diferentes moduladores del metabolismo, preincubados en dos condiciones (mT-H: condiciones de supervivencia (cuadrados y barras rojas); mT-BH: condiciones de capacitación (cuadrados y barras azules)) a lo largo del tiempo. (A) Respuesta de ECAR a lo largo del tiempo en espermatozoides preincubados en mTH o mT-BH, a la inhibición de la OXPHOS con oligo (concentración final: 5 μ M). (B) Respuesta de ECAR a lo largo del tiempo en espermatozoides preincubados en mTH o mT-BH, a la inhibición de la glicólisis con ox (concentración final: 30 mM) (C) Respuesta de ECAR a lo largo del tiempo en espermatozoides preincubados en mTH o mT-BH, a la inhibición de la glicólisis con 2DOG (concentración final: 50 mM). (D) Porcentaje de ECAR sobre el control en espermatozoides preincubados en mT-H o mT-BH en cada uno de los tratamientos: control, oligo (concentración final: 5 μ M), ox (concentración final: 30mM) y 2DOG (concentración final: 50 mM). Los ($p < 0,05$). Las letras representan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medio y tratamientos.

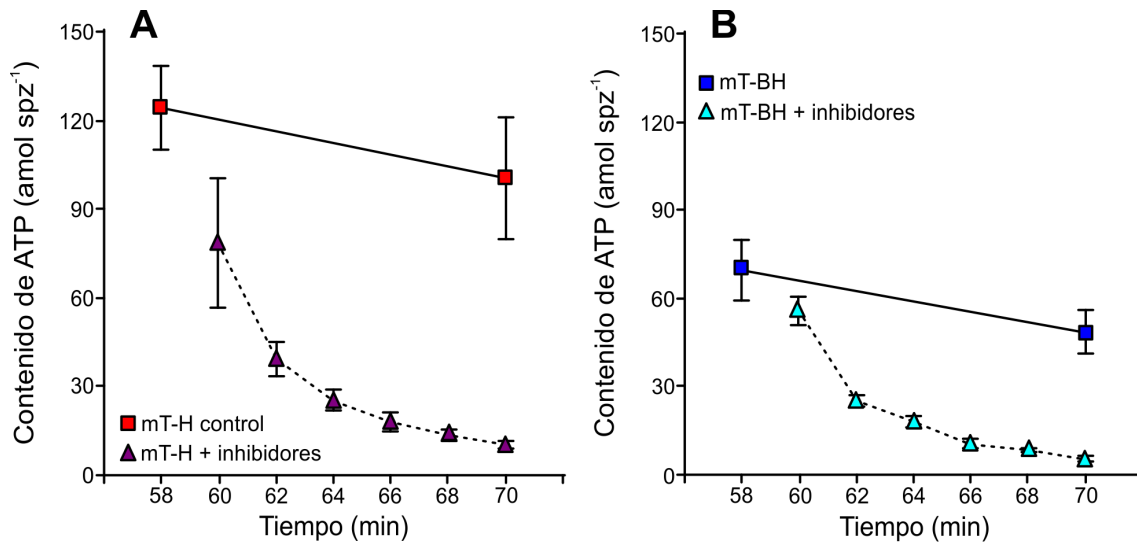


Figura 34. Contenido de ATP en espermatozoides de *M. spicilegus* incubados en condiciones de supervivencia (medio mT-H) y capacitación (mT-BH). El contenido de ATP se midió en espermatozoides incubados en cada uno de los dos medios después de una incubación de 1 h y con el añadido de inhibidores para bloquear la producción de ATP durante un período de 10 min adicionales de incubación (desde los 60 min hasta los 70 min de incubación). (A) Variaciones en el contenido de ATP durante 10 min después de una preincubación de 1 h en mT-H. Control mT-H: cuadrados rojos. Tratamiento con inhibidores (1 μ M antimicina A, 1 μ M rotenona, 5 μ M oligomicina, 50 mM 2DOG): triángulos morados. (B) Variaciones en el contenido de ATP durante 10 min después de una preincubación de 1 h en mT-BH. Control mT-BH: cuadrados azules. Tratamiento con inhibidores (1 μ M Antimicina A, 1 μ M rotenona, 5 μ M oligomicina, 50 mM 2DOG).

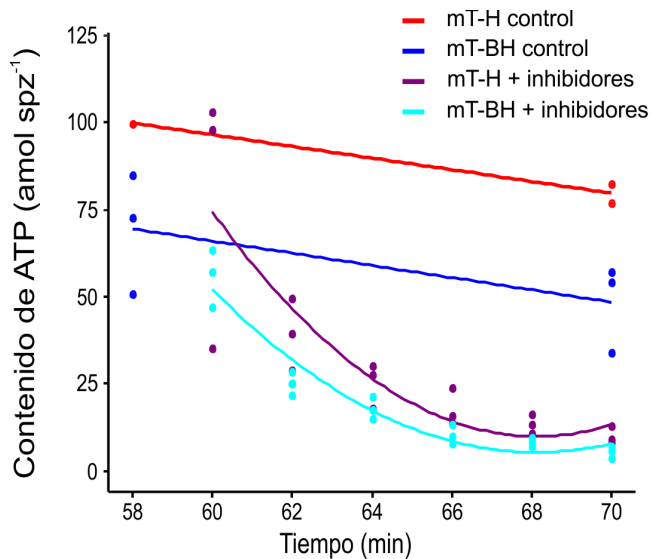


Figura 35. Estimación de la tasa de consumo de ATP en espermatozoides de *M. spicilegus*. Control: consumo de ATP entre los minutos 58 y 70 en ambos medios de incubación (mT-H: condiciones de supervivencia y mT-BH: condiciones de capacitación). Tratamiento con inhibidores (1 μ M antimicina A, 1 μ M rotenona, 5 μ M oligomicina, 50 mM 2DOG): funciones ajustadas ($Y = a + b^x$) al consumo de ATP entre los minutos 60 y 70 en ambos medios de incubación. Control mT-H: círculos rojos y línea de regresión roja. Control mT-BH: círculos azules oscuros y línea de regresión azul oscuro. Tratamiento con inhibidores en mT-H: círculos morados y línea de regresión morada. Tratamiento con inhibidores en mT-BH: círculos azules turquesas y línea de regresión azul turquesa.

Serie IV

Efecto de la viscosidad sobre la producción energética durante la supervivencia y la capacitación de espermatozoides de tres especies de ratón (*Mus musculus*, *Mus spretus* y *M. spicilegus*)

Viabilidad, motilidad y capacitación de espermatozoides incubados en baja y alta viscosidad

El porcentaje de células viables después de 120 min de incubación en condiciones de supervivencia (medio mT-H) y de capacitación (medio mT-BH), tanto en baja como en alta viscosidad, fue constante en las tres especies (Fig. 36A-C; Tabla 14). El porcentaje de espermatozoides móviles decreció significativamente a lo largo del tiempo, pero no se observaron diferencias significativas entre las diferentes condiciones de incubación (Fig. 36D-F; Tabla 14).

El porcentaje de células viables que presenta el patrón B de capacitación con tinción de CTC se mantuvo bajo y constante a lo largo del tiempo en condiciones de supervivencia (medio mT-H) en baja y alta viscosidad en las tres especies (Fig. 37; Tabla 14). En condiciones de capacitación (medio mT-BH) el porcentaje de células viables con patrón B aumentó significativamente a lo largo del tiempo, siendo significativamente mayor que el observado en condiciones de supervivencia en las tres especies (Fig. 37; Tabla 14). No se encontraron diferencias en el porcentaje de células viables con patrón B de los espermatozoides de las tres especies que fueron incubados en condiciones de capacitación (mT-BH) en baja o alta viscosidad (Fig. 37; Tabla 14).

Comparación de espermatozoides incubados en baja y alta viscosidad en condiciones de supervivencia (medio mT-H)

El parámetro OSV representa la velocidad general del espermatozoide. Se observaron diferencias significativas en los valores de OSV de los espermatozoides incubados en condiciones de supervivencia en baja o alta viscosidad en las tres especies a lo largo del tiempo (Tabla 15). Los espermatozoides incubados en baja viscosidad presentaron una velocidad general mayor, que los espermatozoides incubados en alta viscosidad (Fig. 38A-C).

La trayectoria de los espermatozoides está representada por OTS 1 y OTS 2. OTS 1 está relacionado positivamente con la linearidad (LIN) y la rectitud (STR) y el coeficiente de Wobble (WOB) de los espermatozoides en *M. musculus* y *M. spicilegus* (Tabla 4). Cuanto mayor es LIN, STR y WOB, mayores valores presenta OTS 1. En estas dos especies los valores de OTS 1 para espermatozoides incubados en alta viscosidad fueron mayores que los de aquellos que fueron incubados en baja viscosidad. La linearidad se mantuvo estable en alta viscosidad a lo largo del tiempo y disminuyó a lo largo del tiempo en baja viscosidad (Fig. 39A,C; Tabla 15). En el caso de *M. spretus*, OTS 1 está

altamente influenciado por el coeficiente de Wobble (WOB,) el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y la frecuencia de cruce del batido flagelar (BCF (Tabla 4)). Por tanto, a mayor BCF y ALH, y menor WOB, menores valores de OTS 1. Los valores de OTS 1 en alta viscosidad fueron mayores que los observados en baja viscosidad y se mantuvieron estables a lo largo del tiempo, presentando un movimiento más progresivo, con menor desplazamiento lateral de la cabeza (Fig. 39B; Tabla 15).

La OTS 2 en *M. musculus* y *M. spicilegus* está mayormente influenciada por la frecuencia de cruce de batido flagelar. A mayor desplazamiento lateral del movimiento, mayores son los valores de OTS 2 (Tabla 4). Los valores de OTS 2 de los espermatozoides incubados en alta viscosidad presentaron un movimiento más lineal que los espermatozoides incubados en baja viscosidad. En ambos casos los valores disminuyeron a lo largo del tiempo (Fig.39D,F; Tabla 15). En el caso de *M. spretus*, OTS 2 está representado por LIN y STR. A mayor linearidad en el movimiento, mayores valores de OTS 2 (Tabla 4). En este caso no se observaron diferencias entre los espermatozoides incubados en baja y alta viscosidad (Fig. 39E; Tabla 15).

El contenido de ATP decreció con el tiempo en las tres especies incubadas en condiciones de supervivencia, tanto en los espermatozoides en alta como en baja viscosidad. En *M. musculus* (Fig. 40A) y *M. spicilegus* (Fig. 40C) se encontraron diferencias significativas entre los espermatozoides incubados en baja o alta viscosidad. Los espermatozoides incubados en baja viscosidad presentaron mayor contenido de ATP que los espermatozoides incubados en alta viscosidad a partir de los 60 minutos en *M. musculus*. En *M. spicilegus* esta diferencia sólo se observó inicialmente (0 min), desapareciendo a partir de los 60 min. En *M. spretus* no se encontraron diferencias en el contenido de ATP entre los espermatozoides incubados en baja y alta viscosidad (Fig. 40B).

Comparación de espermatozoides incubados en baja y alta viscosidad en condiciones de capacitación (medio mT-BH)

Durante la incubación en condiciones capacitantes se observó un cambio en el patrón de natación espermática, conocido como hiperactivación. Este cambio en la cinética espermática podría verse influenciado por un cambio en la viscosidad del medio de cultivo.

La velocidad general del espermatozoide (OSV) fue significativamente diferente entre los espermatozoides incubados en baja y alta viscosidad en las tres especies estudiadas (Tabla 16). La OSV presentó valores mayores en los espermatozoides incubados en baja viscosidad a lo largo de los 120 min de incubación en las tres especies (Fig. 41A-C). En *M. musculus* (Fig. 41A) y *M. spicilegus* (Fig. 41C), la velocidad general de los espermatozoides disminuyó a lo largo del tiempo en baja viscosidad. En el medio con alta viscosidad, el descenso se observó entre tiempo 0 y los 60 min de incubación. En *M. spretus* (Fig. 41B), si bien los valores de OSV son mayores en medio de baja

viscosidad, los valores se mantuvieron estables a lo largo del tiempo en baja y alta viscosidad.

Como en el caso de los espermatozoides incubados en condiciones de supervivencia, OTS 1 está relacionado con la linearidad, la rectitud y el coeficiente de Wobble en *M. musculus* y *M. spicilegus*. En ambas especies, los valores de OTS 1 en alta viscosidad son mayores que los incubados en baja viscosidad; los espermatozoides incubados en condiciones de alta viscosidad presentan un movimiento más lineal (Fig. 42A,C). En el caso de *M. spretus*, se observó que a menor desplazamiento de la cabeza hay mayores valores de OTS 1. Los valores de OTS 1 en los espermatozoides incubados en alta viscosidad fueron mayores que los valores de OTS 1 en los espermatozoides incubados en baja viscosidad. Presentan un tipo de movimiento más lineal que los espermatozoides incubados en un medio con alta viscosidad (Fig. 42B).

En el caso de OTS 2, en *M. musculus* (Fig. 42D) y *M. spicilegus* (Fig. 42F), este parámetro está relacionado con el desplazamiento lateral del movimiento, observándose que a mayores valores de OTS 2 los espermatozoides presentan mayor desplazamiento lateral. En el caso de estas dos especies los valores en alta viscosidad son menores que los valores de los espermatozoides incubados en baja viscosidad. La viscosidad aporta linearidad al movimiento hiperactivado. En el caso de *M. spretus*, OTS 2 está relacionada con la linearidad, comprobándose que a mayores valores de OTS 2 los espermatozoides muestran una mayor linearidad. En este caso, no se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos (Fig. 42E).

El contenido de ATP disminuyó significativamente en las tres especies a lo largo del tiempo de incubación en condiciones de capacitación, tanto en un medio con baja viscosidad como con alta viscosidad (Tabla 16). El contenido de ATP fue menor en el medio con alta viscosidad, pero no siempre se observaron diferencias significativas. En *M. musculus* se encontraron diferencias significativas a partir de los 60 min de incubación (Fig. 43A). En *M. spretus* se observaron diferencias significativas únicamente a los 60 min de incubación, desapareciendo esas diferencias a los 120 min. (Fig. 43B). En *M. spicilegus*, se encontraron diferencias significativas desde el inicio de la incubación hasta los 60 min, igualándose al final de la incubación, ya que el contenido de ATP decreció más rápidamente en el medio con baja viscosidad (Fig. 43C).

Comparación de espermatozoides incubados en condiciones de supervivencia y capacitación en alta viscosidad.

Se compararon parámetros de espermatozoides incubados en presencia de 2% PVP (alta viscosidad) en condiciones de supervivencia (medio mT-H) o de capacitación (medio mT-BH). En las tres especies estudiadas los valores de velocidad total de los espermatozoides (OSV) fueron menores en aquellos incubados en condiciones de capacitación (Tabla 17). En espermatozoides de *M. musculus* incubados en las dos condiciones disminuyó la OSV a lo largo del tiempo, aunque en condiciones de

capacitación decreció más rápidamente entre el tiempo 0 y 60 min, mientras que en condiciones de supervivencia esta disminución se observó durante los 120 min de incubación (Fig. 44A). En espermatozoides de *M. spretus* y *M. spicilegus* incubados en condiciones de capacitación la OSV disminuyó a lo largo del tiempo, mientras que en condiciones de supervivencia la OSV se mantuvo estable (Fig. 44B,C).

En relación a la OTS 1, no se observan diferencias significativas entre condiciones de supervivencia y capacitación en espermatozoides de *M. musculus* y *M. spicilegus* (Fig. 45A,C; Tabla 17). En el caso de *M. spretus*, los espermatozoides incubados en condiciones de supervivencia mostraron que la OTS 1 se mantuvo estable, mientras que en condiciones de capacitación la OTS 1 aumentó a lo largo del tiempo. Además se encontraron diferencias entre ambas condiciones de incubación los 60 min (Fig. 45B; Tabla 17).

Para los valores de OTS 2, los espermatozoides de *M. musculus* y *M. spicilegus* incubados en condiciones de supervivencia y capacitación evidenciaron una disminución con el tiempo, aunque tal descenso fue mayor en condiciones de capacitación, por lo que existieron diferencias significativas entre ambas condiciones (Fig. 45D,F; Tabla 17). En espermatozoides de *M. spretus* no se observaron diferencias significativas entre las condiciones de supervivencia o de capacitación, pero si se observó una disminución de OTS 2 en el tiempo, tanto en condiciones de supervivencia como en condiciones de capacitación (Fig. 45E; Tabla 17).

El contenido de ATP disminuyó significativamente a lo largo del tiempo en condiciones de supervivencia y de capacitación, en alta viscosidad, y en las tres especies. No se observaron diferencias significativas entre ambas condiciones de incubación en espermatozoides que se mantuvieron a alta viscosidad (Fig. 46A-C; Tabla 17).

Tabla 14. Efecto del tiempo y de la incubación en baja y alta viscosidad, en condiciones de supervivencia y capacitación (tratamiento), sobre la viabilidad, motilidad y el porcentaje de patrón B (indicativo de capacitación) en espermatozoides de *M. musculus*, *M. spretus* y *Mus spicilegus*.. Los valores en negrita indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Variable dependiente	Variable independiente	<i>Mus musculus</i>		<i>Mus spretus</i>		<i>Mus spicilegus</i>	
		<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Viabilidad (%)	Tratamiento	1,45	0,245	0,32	0,813	2,22	0,107
	Tiempo	2,02	0,149	8,64	0,001	3,5	0,043
	Tratamiento*Tiempo	0,19	0,978	0,22	0,966	0,35	0,905
Motilidad (%)	Tratamiento	0,17	0,915	0,43	0,734	0,12	0,945
	Tiempo	34,12	<0,0001	10,13	<0,0001	13,93	<0,0001
	Tratamiento*Tiempo	0,52	0,785	0,3	0,934	0,39	0,878
Patrón B de tinción con CTC (%)	Tratamiento	213,77	<0,0001	5,35	0,005	77,97	<0,0001
	Tiempo	211,89	<0,0001	6,98	0,003	60,97	<0,0001
	Tratamiento*Tiempo	55,53	<0,0001	2,69	0,034	20,61	<0,0001

Tabla 15. Efecto del tiempo y de la incubación en condiciones de supervivencia en baja o alta viscosidad (tratamiento) sobre la velocidad global (overall sperm velocity, OSV), dos componentes de trayectoria de natación (overall trajectory shape, OTS), y contenido de ATP en espermatozoides de *M. musculus*, *M. spretus* y *Mus spicilegus*. Los valores en negrita indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Variable dependiente	Variable independiente	<i>Mus musculus</i>		<i>Mus spretus</i>		<i>Mus spicilegus</i>	
		<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
OSV	Tratamiento	133,52	<0,0001	227,53	<0,0001	290,01	<0,0001
	Tiempo	4,91	0,023	6,63	0,011	15,53	<0,0001
	Tratamiento*Tiempo	1,5	0,256	4,94	0,27	16,12	<0,0001
OTS 1	Tratamiento	67,30	<0,0001	63,85	<0,0001	34,32	<0,0001
	Tiempo	4,98	0,019	3,63	0,05	6,67	0,009
	Tratamiento*Tiempo	2,08	0,153	1,05	0,372	0,83	0,454
OTS 2	Tratamiento	6,56	0,02	1,52	0,23	19,02	0,001
	Tiempo	7,16	0,005	6,61	0,008	9,21	0,003
	Tratamiento*Tiempo	0,29	0,753	0,01	0,992	0,26	0,775
Contenido de ATP (amoles/spz)	Tratamiento	11,42	0,004	0,77	0,395	31,27	<0,0001
	Tiempo	26,75	<0,0001	32,46	<0,0001	217,90	<0,0001
	Tratamiento*Tiempo	0,221	0,804	1,17	0,336	11,5	0,001

Tabla 16. Efecto del tiempo y de la incubación en condiciones de capacitación en baja o alta viscosidad (tratamiento), sobre la velocidad global (overall sperm velocity, OSV), dos componentes de trayectoria de natación (overall trajectory shape, OTS), y contenido de ATP en espermatozoides de *M. musculus*, *M. spretus* y *Mus spicilegus*. Los valores en negrita indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Variable dependiente	Variable independiente	<i>Mus musculus</i>		<i>Mus spretus</i>		<i>Mus spicilegus</i>	
		<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
OSV	Tratamiento	108,25	<0,0001	201,64	<0,0001	266,43	<0,0001
	Tiempo	14,94	<0,0001	2,28	0,134	60,76	<0,0001
	Tratamiento*Tiempo	1,72	0,212	0,14	0,868	12,51	<0,0001
OTS 1	Tratamiento	82,52	<0,0001	228,50	<0,0001	46,55	<0,0001
	Tiempo	5,87	0,014	2,42	0,121	10,13	0,001
	Tratamiento*Tiempo	0,84	0,453	2,43	0,121	0,51	0,608
OTS 2	Tratamiento	10,29	0,006	0,08	0,787	32,4	<0,0001
	Tiempo	13,61	0,001	2,16	0,147	56,29	<0,0001
	Tratamiento*Tiempo	1,08	0,365	0,08	0,927	0,22	0,806
Contenido de ATP (amoles/spz)	Tratamiento	34,46	<0,0001	6,33	0,021	39,03	<0,0001
	Tiempo	42,77	<0,0001	14,25	<0,0001	145,39	<0,0001
	Tratamiento*Tiempo	1,19	0,330	0,02	0,977	5,99	0,012

Tabla 17. Efecto del tiempo y de la incubación en alta viscosidad en condiciones de supervivencia o capacitación (tratamiento) sobre la velocidad global (overall sperm velocity, OSV), dos componentes de trayectoria de natación (overall trajectory shape, OTS), y contenido de ATP en espermatozoides de *M. musculus*, *M. spretus* y *Mus spicilegus*. Los valores en negrita indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Variable dependiente	Variable independiente	<i>Mus musculus</i>		<i>Mus spretus</i>		<i>Mus spicilegus</i>	
		<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
OSV	Tratamiento	10,83	0,005	26,68	<0,0001	66,23	<0,0001
	Tiempo	40,75	<0,0001	22,41	<0,0001	25,64	<0,0001
	Tratamiento*Tiempo	4,97	0,022	8,28	0,005	15,59	<0,0001
OTS 1	Tratamiento	0,3	0,592	5,92	0,027	0,38	0,545
	Tiempo	5,87	0,013	3,11	0,072	3,74	0,046
	Tratamiento*Tiempo	0,6	0,563	1,97	0,172	0,09	0,916
OTS 2	Tratamiento	5,15	0,038	0,9	0,361	10,02	0,007
	Tiempo	22,68	<0,0001	30,87	<0,0001	25,19	<0,0001
	Tratamiento*Tiempo	2,30	0,134	2,64	0,112	2,73	0,101
Contenido de ATP (amoles/spz)	Tratamiento	1,16	0,299	0,34	0,569	0,03	0,861
	Tiempo	44,7	<0,0001	13,8	<0,0001	87,97	<0,0001
	Tratamiento*Tiempo	1,03	0,380	0,36	0,701	0,26	0,775

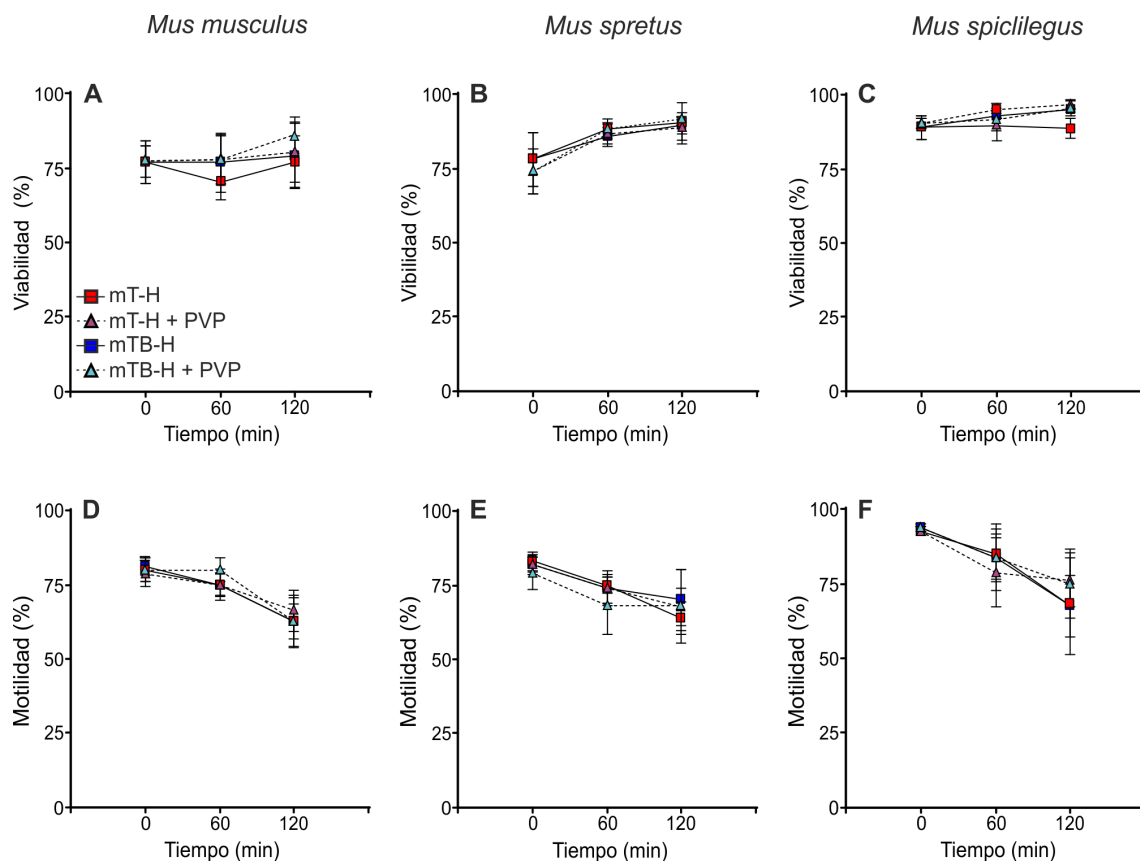
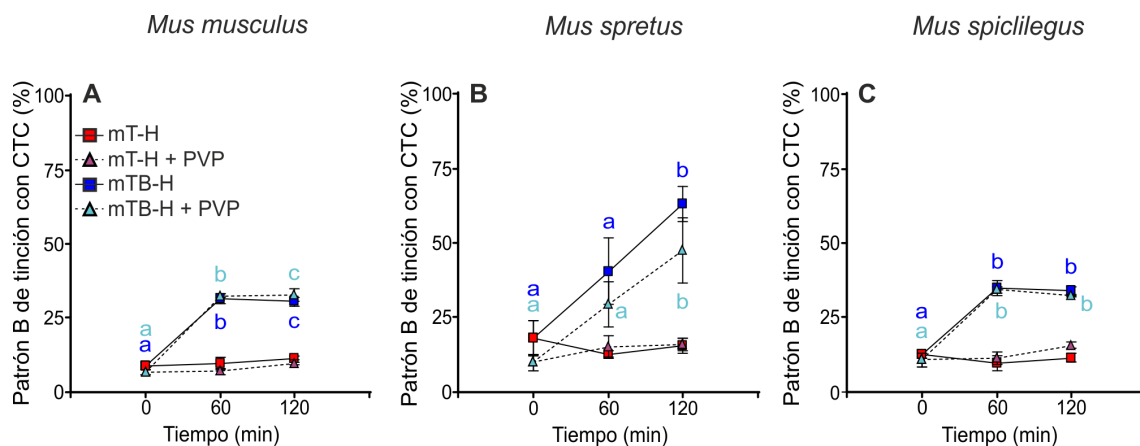


Figura 36. Porcentaje de viabilidad y porcentaje de motilidad de espermatozoides de tres especies de ratones (*M. musculus*, *M. spretus* y *M. spicilegus*), a lo largo del tiempo, incubados en condiciones de supervivencia o capacitación en medio con baja o alta viscosidad. Los espermatozoides se incubaron en condiciones de supervivencia en baja viscosidad (mT-H) (cuadrados rojos y línea continua) o alta viscosidad (mT-H + PVP) (triángulos rosas y línea discontinua). Por otra parte se incubaron en condiciones de capacitación en baja viscosidad (mT-BH) (cuadrados azules y línea continua) y alta viscosidad (mT-BH + PVP) (triángulos azules turquesa y línea discontinua). Los resultados son las medias \pm SE ($n = 4$ en *M. musculus*, $n = 5$ en *M. spretus* y $n = 4$ en *M. spicilegus*). A-C: Viabilidad (%). D-F: Motilidad (%). A, D: *M. musculus*, B, E: *M. spretus*, C, F: *M. spicilegus*.



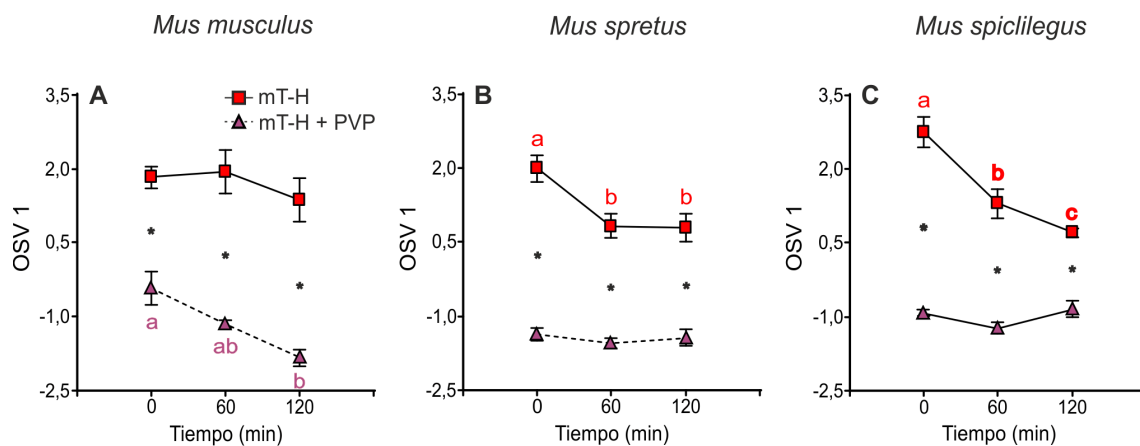


Figura 38. Variación de OSV 1 en los espermatozoides de tres especies de ratones (*M. musculus*, *M. spretus* y *M. spicilegus*) a lo largo del tiempo incubados en condiciones de supervivencia en baja viscosidad (mT-H) (cuadrados rojos y línea continua) y alta viscosidad (mT-H +PVP) (triángulos rosas y línea discontinua). Los resultados son las medias \pm SE ($n = 4$ en *M. musculus*, $n = 5$ en *M. spretus* y $n = 4$ en *M. spicilegus*). A: *M. musculus*, B: *M. spretus*, C: *M. spicilegus*. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo tiempo con un análisis estadístico post hoc de Fisher. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,005$) entre los tiempos para el mismo tratamiento con un análisis estadístico post hoc de Fisher.

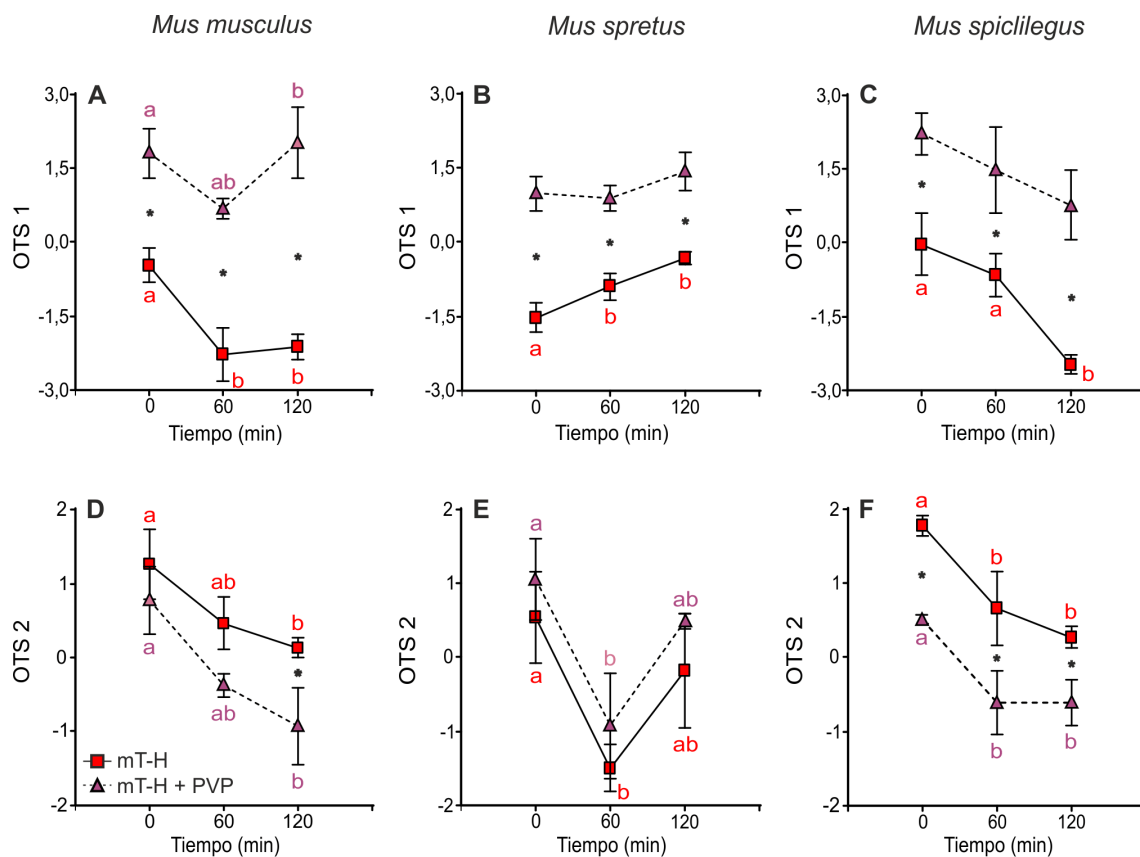


Figura 39. Variación de OTS 1 y OTS 2 a lo largo del tiempo en los espermatozoides de tres especies de ratones (*M. musculus*, *M. spretus* y *M. spicilegus*) incubados en condiciones de supervivencia en baja viscosidad (mT-H) (cuadrados rojos y línea continua) y alta viscosidad (mT-H +PVP) (triángulos morados y línea discontinua). Los resultados son las medias \pm SE ($n = 4$ en *M. musculus*, $n = 5$ en *M. spretus* y $n = 4$ en *M. spicilegus*). A-C: OTS 1. D-F: OTS 2. A, D: *M. musculus*, B, E: *M. spretus*, C, F: *M. spicilegus*. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo tiempo con un análisis estadístico post hoc de Fisher. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,005$) entre los tiempos para el mismo tratamiento con un análisis estadístico post hoc de Fisher.

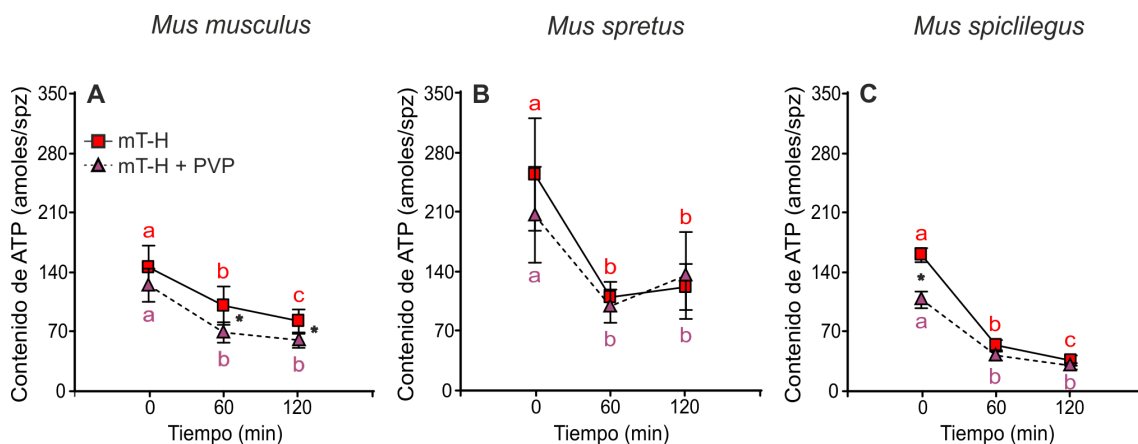


Figura 40. Variación del contenido de ATP (amoles/spz) en los espermatozoides de tres especies de ratones (*M. musculus*, *M. spretus* y *M. spicilegus*) a lo largo del tiempo incubados en condiciones de supervivencia en baja viscosidad (mT-H) (cuadrados rojos y línea continua) y alta viscosidad (mT-H +PVP) (cuadrados rosas y línea discontinua). Los resultados son las medias \pm SE ($n = 4$ en *M. musculus*, $n = 5$ en *M. spretus* y $n = 4$ en *M. spicilegus*). A: *M. musculus*, B: *M. spretus*, C: *M. spicilegus*. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo tiempo con un análisis estadístico post hoc de Fisher. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,005$) entre los tiempos para el mismo tratamiento con un análisis estadístico post hoc de Fisher.

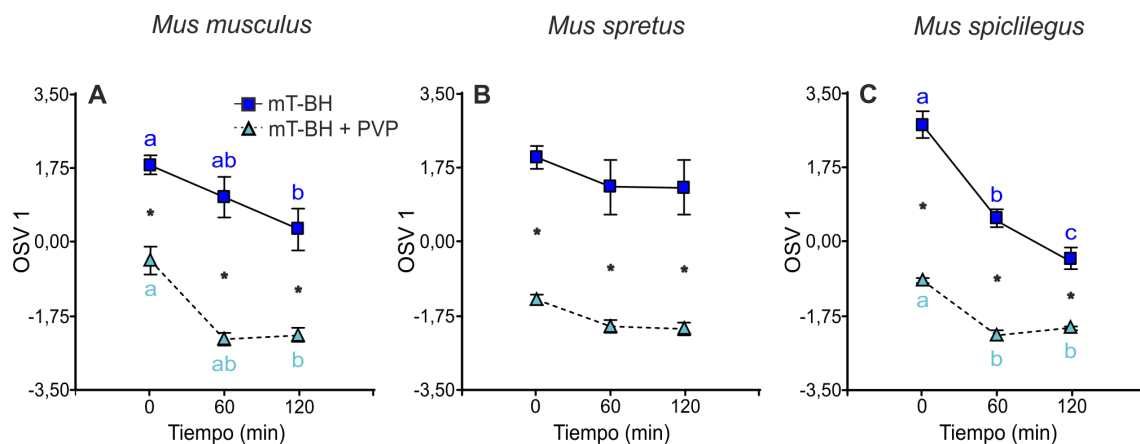


Figura 41. Variación de OSV 1 en los espermatozoides de tres especies de ratones (*M. musculus*, *M. spretus* y *M. spicilegus*) a lo largo del tiempo incubados en condiciones de capacitación en baja viscosidad (mT-BH) (cuadrados azules y línea continua) y alta viscosidad (mT-BH +PVP) (triángulos azules turquesa y línea discontinua). A: *M. musculus*, B: *M. spretus* y C: *M. spicilegus*. Los resultados son las medias \pm SE (n = 4 en *M. musculus*, n = 5 en *M. spretus* y n= 4 en *M.spicilegus*). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo tiempo con un análisis estadístico post hoc de Fisher. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,005$) entre los tiempos para el mismo tratamiento con un análisis estadístico post hoc de Fisher.

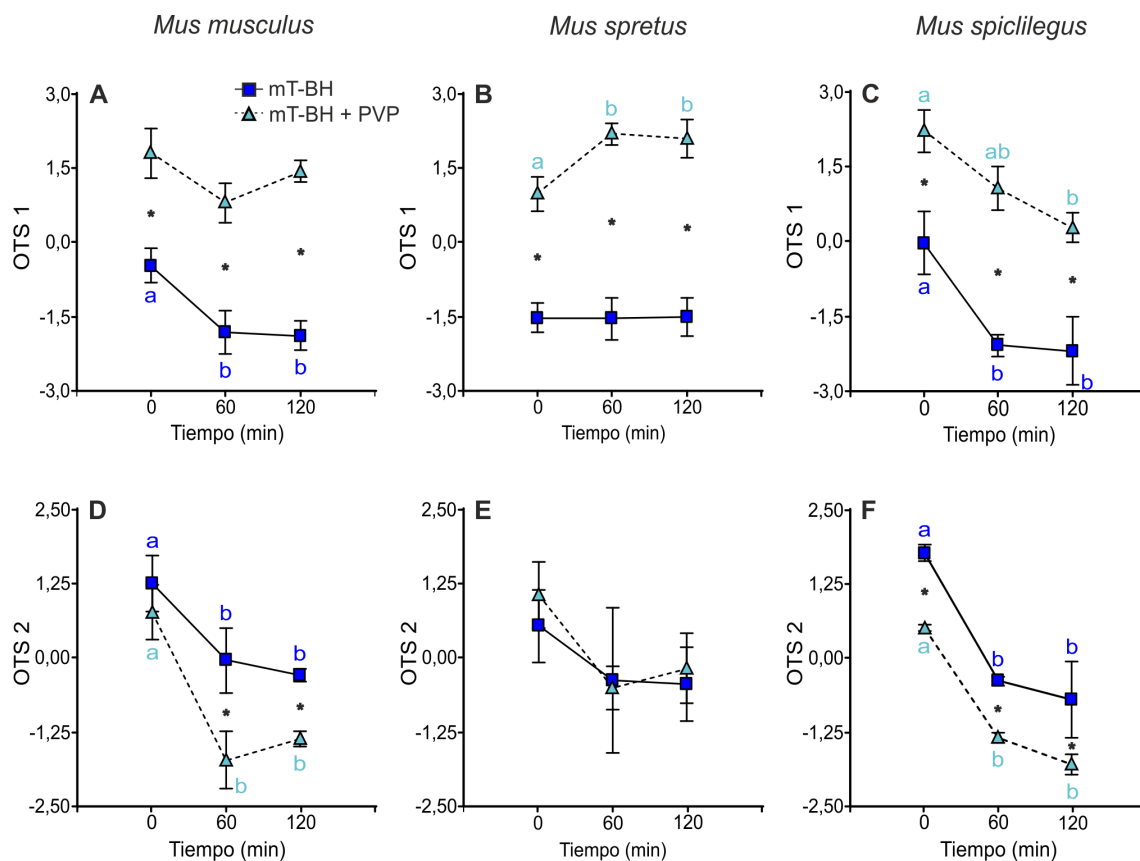


Figura 42. Variación de OTS 1 y OTS 2 en los espermatozoides de tres especies de ratones (*M. musculus*, *M. spretus* y *M. spicilegus*) a lo largo del tiempo incubados en condiciones de capacitación en baja viscosidad (mT-BH) (cuadrados azules y línea continua) y alta viscosidad (mT-BH +PVP) (triángulos azules turquesas y línea discontinua).. A-C: OTS 1. D-F: OTS 2. A, D: *M. musculus*, B, E: *M. spretus*, C, F: *M. spicilegus*. Los resultados son las medias \pm SE (n = 4 en *M. musculus*, n = 5 en *M. spretus* y n= 4 en *M.spicilegus*). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo tiempo con un análisis estadístico post hoc de Fisher. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,005$) entre los tiempos para el mismo tratamiento con un análisis estadístico post hoc de Fisher.

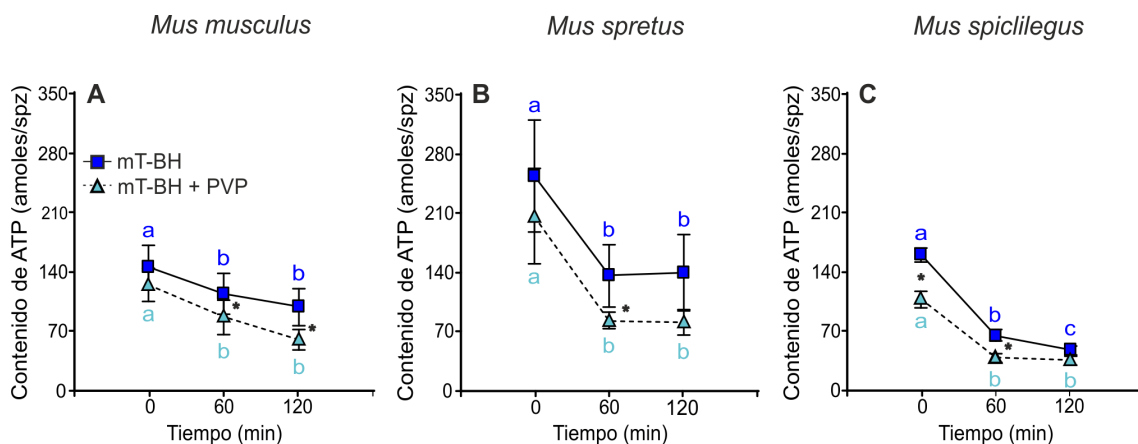


Figura 43. Variación del contenido de ATP (amoles/spz) en los espermatozoides de tres especies de ratones (*M. musculus*, *M. spretus* y *M. spicilegus*) a lo largo del tiempo incubados en condiciones de capacitación en baja viscosidad (mT-BH) (cuadrados azules y línea continua) y alta viscosidad (mT-BH +PVP) (triángulos azules turquesa y línea discontinua). A: *M. musculus*, B: *M. spretus* y C: *M. spicilegus*. Los resultados son las medias \pm SE ($n = 4$ en *M. musculus*, $n = 5$ en *M. spretus* y $n = 4$ en *M. spicilegus*). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo tiempo con un análisis estadístico post hoc de Fisher. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,005$) entre los tiempos para el mismo tratamiento con un análisis estadístico post hoc de Fisher.

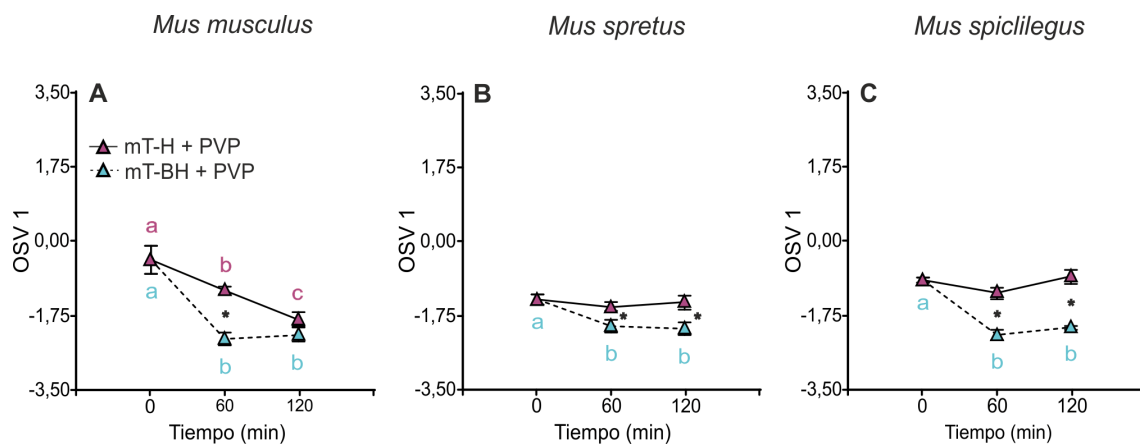


Figura 44. Variación de OSV 1 en los espermatozoides de tres especies de ratones (*M. musculus*, *M. spretus* y *M. spicilegus*) a lo largo del tiempo incubados en condiciones de supervivencia en alta viscosidad (mT-H +PVP) (triángulos rosas y línea continua) e incubados en condiciones de capacitación en alta viscosidad (mT-BH + PVP) (triángulos azules turquesa y línea discontinua). A: *M. musculus*, B: *M. spretus* y C: *M. spicilegus*. Los resultados son las medias \pm SE ($n = 4$ en *M. musculus*, $n = 5$ en *M. spretus* y $n = 4$ en *M. spicilegus*). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo tiempo con un análisis estadístico post hoc de Fisher. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,005$) entre los tiempos para el mismo tratamiento con un análisis estadístico post hoc de Fisher.

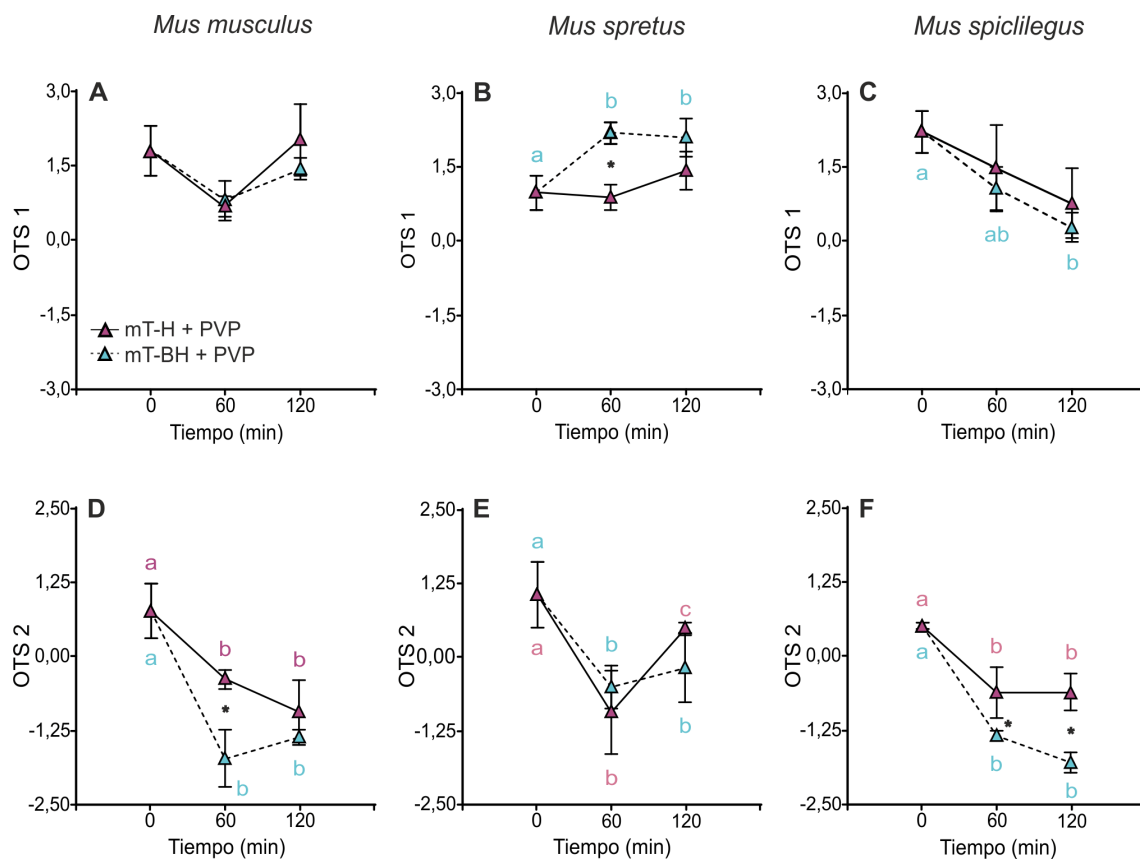


Figura 45. Variación de OTS 1 y OTS 2 en los espermatozoides de tres especies de ratones (*M. musculus*, *M. spretus* y *M. spicilegus*) a lo largo del tiempo incubados en condiciones de supervivencia en alta viscosidad (mT-H + PVP) (triángulos rosas y línea continua) e incubados en condiciones de capacitación en alta viscosidad (mT-BH + PVP) (triángulos azules turquesa y línea discontinua). A-C: OTS 1. D-F: OTS 2. A, D: *M. musculus*, B, E: *M. spretus* y C, F: *M. spicilegus*. Los resultados son las medias \pm SE ($n = 4$ en *M. musculus*, $n = 5$ en *M. spretus* y $n = 4$ en *M. spicilegus*). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo tiempo con un análisis estadístico post hoc de Fisher. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,005$) entre los tiempos para el mismo tratamiento con un análisis estadístico post hoc de Fisher.

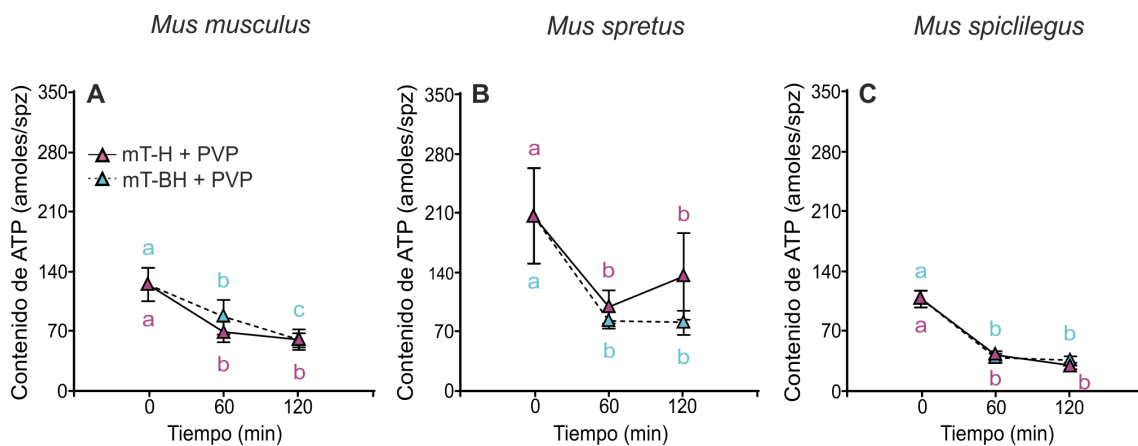


Figura 46. Variación del contenido de ATP (amoles/spz) en los espermatozoides de tres especies de ratones (*M. musculus*, *M. spretus* y *M. spicilegus*) a lo largo del tiempo incubados en condiciones de supervivencia en alta viscosidad (mT-H +PVP) (triángulos rosas y línea continua) e incubados en condiciones de capacitación en alta viscosidad (mT-BH + PVP) (triángulos azules turquesa y línea discontinua). A: *M. musculus*, B: *M. spretus* y C: *M. spicilegus*. Los resultados son las medias \pm SE ($n = 4$ en *M. musculus*, $n = 5$ en *M. spretus* y $n = 4$ en *M. spicilegus*). Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,005$) entre los tiempos para el mismo tratamiento con un análisis estadístico post hoc de Fisher.

Discusión

Serie I: Metabolismo energético durante la capacitación e hiperactivación en espermatozoides de tres especies de ratón (*Mus musculus*, *Mus spretus* y *Mus spicilegus*)

Los resultados de este estudio mostraron que la capacitación promueve cambios en los patrones de natación y en la bioenergética de los espermatozoides de las tres especies de ratones del género *Mus* (*M. musculus*, *M. spretus* y *M. spicilegus*) y que estos cambios varían en magnitud y tiempo de una forma específica en cada especie. Además, se encontraron diferencias entre las especies con respecto a la motilidad de los espermatozoides y los niveles de ATP en condiciones de supervivencia.

Nuestros resultados muestran que tanto el porcentaje máximo de células capacitadas, como el tiempo en el cual se alcanza el máximo porcentaje de células con esta condición, difieren entre las tres especies. *M. musculus* mostró un porcentaje máximo de células capacitadas que el menor de las tres especies (~ 40%), seguido de *M. spretus* (~ 60%), mientras que *M. spicilegus* (~ 70%) presentó el mayor porcentaje de espermatozoides capacitados. Estos resultados coinciden con estudios anteriores (Gomendio et al., 2006). Respecto al momento de máxima capacitación, los espermatozoides de *M. musculus* y *M. spicilegus* alcanzaron el porcentaje máximo de células capacitadas a los 60 min, mientras que en los de *M. spretus* los porcentajes máximos de capacitación se observaron a los 90 min, aunque el pico podría estar todavía más lejos en tiempo, ya que en este estudio se finalizó la incubación a los 90 min. Las diferencias sugieren una variación en las estrategias desarrolladas por estas especies con respecto al tiempo y la eficacia de la fecundación.

La proporción de células viables se mantuvo estable a lo largo del tiempo tanto en condiciones de supervivencia como en condiciones de capacitación en las tres especies estudiadas. Sin embargo, no todos los espermatozoides viables (y capacitados) son capaces de fecundar, ya que para ello deben mantener la motilidad y responder a los estímulos del óvulo, para alcanzar el sitio de fecundación y atravesar las cubiertas del óvulo. Estudios previos en ratones de laboratorio mostraron que el proceso de capacitación tiene un efecto perjudicial en la motilidad del espermatozoide (Yanagimachi, 1970; 1994; Suárez, 1996; Ho y Suarez, 2001; Baker et al., 2006; Goodson et al., 2011). En nuestro estudio, los espermatozoides de las especies con mayor porcentaje de células capacitadas, *M. spretus* y *M. spicilegus*, mostraron una disminución más pronunciada de la motilidad en condiciones de capacitación. En *M. musculus* no se observaron diferencias entre ambas condiciones, probablemente porque se encontró una disminución marcada de la motilidad también en los espermatozoides en condiciones de supervivencia.

Durante la capacitación los espermatozoides experimentan un cambio en el patrón de natación (velocidad y forma de la trayectoria de los espermatozoides) (Yanagimachi, 1994). En nuestro estudio se observaron cambios en el patrón de motilidad, pero fueron diferentes en cada una de las especies. Cuando los espermatozoides se hiperactivan, la

amplitud de la curva flagelar aumenta (Yanagimachi, 1994; Suarez, 2008; Chang y Suarez, 2011; Goodson et al., 2011). La amplitud lateral de la cabeza (ALH) es una medida indirecta de la amplitud de la curva flagelar porque la cabeza se mueve de lado a lado desarrollando curvas principales e inversas. En este estudio, el valor promedio de ALH fue mayor en los espermatozoides incubados en un medio capacitante para las tres especies. El desplazamiento lateral de la cabeza se asocia con la linealidad; diferentes estudios mostraron que si el desplazamiento lateral de la cabeza aumenta, disminuye la linealidad de la trayectoria (deLamirande et al., 1997). En nuestro estudio, el aumento del desplazamiento lateral de la cabeza en los espermatozoides incubados en un medio de capacitación, ocasionó una disminución de la linealidad en las tres especies. Sin embargo la velocidad curvilínea de los espermatozoides incubados en condiciones de capacitación fueron menores, y solo en *M. spicilegus* disminuyó con el tiempo. Estos resultados contrastan con los encontrados en otros estudios que observaron un incremento de la velocidad curvilínea en los espermatozoides capacitados (deLamirande et al., 1997; Ho y Suarez, 2001; Goodson et al., 2011). Esta disminución podría deberse a la diferencias que podría existir entre espermatozoides capacitados y no capacitados dentro de las condiciones de capacitación. Al analizar los espermatozoides hiperactivados y no hiperactivados bajo condiciones de capacitación, se han podido observar cambios en el patrón de movimiento, cambios que estaban enmascarados bajo el patrón de movimiento activado. Además cuando se analizaron por separado los parámetros de cinética en los espermatozoides hiperactivados de las tres especies, la hiperactivación aumentó la preponderancia de los componentes laterales del movimiento (desplazamiento lateral de la cabeza, velocidad curvilínea, linealidad decreciente) sobre los componentes progresivos (velocidad rectilínea). Las diferencias que se observaron en ambos resultados pueden deberse a que, aunque se encuentren en un medio capacitante, los espermatozoides pueden no haber completado el proceso de capacitación y no manifiestan hiperactivación.

Diferentes estudios establecieron que la hiperactivación es un marcador útil de capacitación, antes de que tenga lugar la reacción acrosómica (Robertson et al., 1988). Nuestros resultados mostraron una asociación entre la capacitación y la hiperactivación en *M. musculus* y *M. spicilegus*. Así, según aumenta la capacitación a lo largo del tiempo también se observa un aumento de los espermatozoides hiperactivados. Estos resultados coinciden con estudios anteriores en ratones de laboratorio (Suarez, 1996; Baker et al., 2006). Sin embargo, en los espermatozoides de *M. spretus* incubados en condiciones de capacitación existe un aumento en el porcentaje de células capacitadas con el tiempo, pero no aumenta el porcentaje de espermatozoides hiperactivados.

Estos resultados podrían indicar que, en el caso de *M. spretus*, la hiperactivación y la capacitación están dissociadas o que, en esta especie, ALH no es un buen indicador de la hiperactivación ya que, si bien sus valores son diferentes entre espermatozoides incubados en diferentes condiciones, las variaciones temporales de este parámetro no se corresponden con la dinámica temporal de la capacitación. Aunque ALH no sea un buen indicador de hiperactivación para *M. spretus*, existen de todos modos diferencias en las

variables de natación espermática entre los espermatozoides incubados en condiciones de supervivencia y de capacitación, lo que podría indicar que existe una asociación entre la capacitación y la hiperactivación, pudiendo existir un desacople en el tiempo en el cual se produce cada una de los procesos.

La motilidad de los espermatozoides depende completamente de la disponibilidad de energía obtenida de la descomposición enzimática de ATP (Jeulin y Soufir, 1992; Mukai y Okuno, 2004). La capacitación del espermatozoide podría suponer un aumento de la demanda energética en la célula espermática debido a los cambios en la regulación de iones, la activación de vías de señalización intracelular (p. ej. cAMP-PKA) o la fosforilación de proteínas (Visconti et al., 1995; 1999; 2002; 2011; Visconti y Kopf, 1998; Urner et al., 2001; Travis et al., 2004; Goodson et al., 2012; Odet et al., 2013). Tanto en *M. spretus* como en *M. spicilegus*, los espermatozoides incubados bajo condiciones de capacitación presentaron una disminución significativamente más rápida de los niveles de ATP que los espermatozoides incubados bajo condiciones de supervivencia. En contraste, en *M. musculus* no se encontraron esas diferencias entre condiciones de capacitación y de supervivencia.

Las diferencias encontradas entre los espermatozoides capacitados y no capacitados, en *M. spretus* y *M. spicilegus*, podrían deberse a cambios en la motilidad que ocurren en el momento de la capacitación. En concreto, cambios en la relación entre la fuerza de propulsión de los espermatozoides frente a la fuerza transversal promovida por la hiperactivación (Ishijima, 2011) podrían implicar modificaciones fundamentales de las tasas de gasto de ATP en la célula espermática. *M. spretus* y *M. spicilegus* presentan las diferencias más altas entre los tratamientos en relación con el contenido de ATP, así como las diferencias más altas en los parámetros cinéticos asociados con la hiperactivación (VCL, VSL, LIN, ALH y BCF). Estas diferencias en la cantidad de ATP podrían ocurrir como resultado de desviaciones en el balance entre el consumo y la producción de ATP en el espermatozoide. Este desequilibrio podría tener lugar de tres maneras: (a) la producción de ATP podría mantenerse estable, mientras que su consumo aumenta, (b) la producción de ATP podría disminuir mientras que el consumo permanece estable o aumenta, y (c) la producción y el consumo de ATP podría aumentar en diferentes proporciones, aumentando el consumo más rápidamente que la producción.

Estudios anteriores han propuesto que los altos porcentajes de espermatozoides capacitados pueden evolucionar en especies que experimentan altos niveles de competición espermática (Gomendio et al., 2006), un fenómeno que surge debido a la promiscuidad femenina. Dado que, bajo condiciones de competición espermática, los espermatozoides de varios machos competirían para fecundar un conjunto de óvulos (Parker, 1982), un aumento en el porcentaje de espermatozoides capaces de fecundar (es decir, capacitados) aumentaría la eficiencia competitiva del eyaculado. Las diferencias reveladas en nuestro estudio entre las especies analizadas sugieren que el tiempo de capacitación podría haber evolucionado bajo presiones selectivas que son altamente especie-específicas. Además, las divergencias en el progreso temporal de la

hiperactivación de los espermatozoides indicarían que, si bien este proceso está sin duda asociado a la capacitación de los espermatozoides, el patrón de aparición puede variar según la especie. En este estudio las especies que tienen un nivel de competición espermática mayor también presentan un contenido de ATP mayor, pero la caída de este es más pronunciada. Esto podría sugerir que tanto la competición espermática como el proceso de capacitación, incluyendo la hiperactivación, podrían estar influyendo en la producción y/o consumo de ATP. Las diferencias y cambios relacionados con el ATP podrían influir en el número de células que alcanza la capacitación y cambian su patrón de movimiento.

Series II y III: Producción y consumo de ATP en espermatozoides no capacitados y capacitados de *Mus musculus* (B6D2F1) y *Mus spicilegus*. Papel de la glicólisis y fosforilación oxidativa en la generación de energía

Los resultados de este estudio mostraron diferencias significativas en el metabolismo energético de espermatozoides incubados en condiciones capacitantes y no capacitantes. Nuestro estudio examinó tres posibles escenarios en metabolismo espermático: (a) la producción de ATP a través de dos rutas metabólicas principales, glicólisis y fosforilación oxidativa, no varía entre espermatozoides capacitados y no capacitados, pero el consumo de ATP se intensifica en los espermatozoides capacitados; (b) la producción de ATP a través de estas rutas metabólicas varía entre los espermatozoides capacitados y no capacitados, mientras que el consumo de ATP no presenta diferencias y (c) tanto la producción como el consumo de ATP varía entre los espermatozoides capacitados y no capacitados. Nuestros análisis muestran que las diferencias metabólicas entre los espermatozoides capacitados y no capacitados de *Mus musculus* (B6D2F1) y *M. spicilegus* se encuentran en la producción de ATP a través de las dos vías metabólicas principales, la fosforilación oxidativa y la glicolisis, mientras que el consumo de ATP no se ve afectado por el proceso de capacitación.

La concentración de sustratos metabólicos en el tracto genital de la hembra de ratón no se conoce aún con precisión, pero se sabe que durante la ovulación existen cantidades elevadas de glucosa y lactato (Gardner y Leese, 1990; Harris et al., 2005), lo cual permite a los espermatozoides la utilización de ambas rutas metabólicas sin limitaciones en el sustrato. El medio empleado en nuestros experimentos está compuesto por glucosa, lactato y piruvato a fin de asemejarlo en la medida de lo posible a las condiciones in vivo, permitiendo a los espermatozoides activar tanto la glicólisis como la OXPHOS. Esto se basó en que estudios previos con ratones mutantes para GAPDH, una enzima implicada en la glicólisis, presentan unos niveles de ATP extremadamente bajos (Miki et al., 2004). Otros estudios utilizaron inhibidores para esta misma enzima y encontraron que los espermatozoides incubados únicamente con glucosa permanecían inmóviles, mientras que si se les incubaba con sustratos para la respiración

mitocondrial, eran móviles (Ford, 2006). Esto sugiere que la presencia de ambos sustratos metabólicos es esencial para el normal funcionamiento de la célula espermática.

Estudios metabólicos muestran que los espermatozoides necesitan la fosforilación oxidativa para conseguir una motilidad progresiva (Odet et al., 2013; Takei et al., 2014) y que son capaces de mantenerla en ausencia de glucosa (Goodson et al., 2012; Mukai y Okuno, 2004; Tanaka et al., 2004), pero también que es necesaria la glicólisis para conseguir la hiperactivación y cambios en la fosforilación de la tirosina asociados con la capacitación de los espermatozoides en diferentes especies de mamíferos (Cooper, 1984; Fraser y Quinn, 1981; Odet et al., 2013; Travis et al., 2001; Urner et al., 2001; Williams y Ford, 2001). El presente estudio es novedoso ya que revela por primera vez las posibles variaciones a nivel metabólico, de producción y consumo de ATP, que pueden existir entre los espermatozoides capacitados y no capacitados.

Nuestros resultados mostraron que los espermatozoides no capacitados presentan unas tasas de respiración máxima mayor que los espermatozoides capacitados pero, a su vez que los espermatozoides capacitados incrementan la liberación de lactato al medio extracelular, lo cual sugiere la existencia de diferencias en la proporción en que se utilizan ambas rutas metabólicas. Estudios anteriores determinaron que los espermatozoides de ratón necesitan la glicólisis como fuente de energía y activación de diferentes procesos celulares (Ford, 2006; Miki et al., 2004). Esta necesidad puede verse aumentada en el momento en el cual los espermatozoides adquieren la capacidad de fecundar. Diferentes estudios establecieron que la glicólisis es esencial para el proceso de capacitación (Hoppe, 1976; Fraser y Quinn, 1981; Cooper et al., 1984; Travis et al., 2001; 2004; Goodson et al., 2012; Odet et al., 2013; Urner et al., 2001; Tanaka et al., 2004). Los resultados de este estudio están de acuerdo con estos resultados previos y, además, los extienden ya que muestran que los espermatozoides capacitados alteran su metabolismo, incrementando la tasa de glicólisis, lo que puede beneficiarlos en el momento de la fecundación.

Estas diferencias a nivel de OXPHOS y glicólisis pueden verse reflejadas en la producción de ATP. Se sabe que la fosforilación oxidativa aporta mayor cantidad de energía en forma de ATP por mol de glucosa que la glicólisis (Ruiz-Pesini et al., 1998; 2000; Nakada et al., 2006). Nuestros resultados muestran que la producción de ATP es menor en los espermatozoides capacitados, lo que podría traducirse en un menor contenido de ATP en la célula, como predicen estudios previos en diferentes especies del género *Mus* (Serie I; Tourmente et al., 2015a; 2018). La fosforilación oxidativa es esencial para mantener una motilidad progresiva en varias especies de mamíferos (Johnson et al., 2010; Odet et al., 2013) y, en ocasiones, mutaciones o inhibiciones de la OXPHOS pueden ocasionar infertilidad (Nakada et al., 2006; Trifunovic et al., 2004) o diferentes alteraciones en diferentes funciones espermáticas (Narisawa et al., 2002). Además, estudios anteriores demostraron que el potencial de membrana mitocondrial está relacionado con diferentes parámetros funcionales de los espermatozoides, incluida la motilidad (Anderson et al., 2007; Paoli et al., 2011; Terrell et al., 2011; Wang et al.,

2012; Agnihotri et al., 2016). La evaluación de la fuga de protones que produce la cadena transportadora de electrones en presencia de oligomicina (mayor en condiciones no capacitantes), sugiere una respiración más eficiente en los espermatozoides capacitados, ya que una mayor proporción de oxígeno consumido se destinaría a la producción de ATP. Adicionalmente, los espermatozoides capacitados son más glicolíticos y presentan una reserva glicolítica mayor, lo cual refuerza la noción de que una vía glicolítica activa es necesaria para diferentes procesos asociados con la capacitación, aunque esta vía metabólica esté asociada a una menor producción de ATP.

La exposición a diferentes inhibidores del metabolismo mostró que los espermatozoides capacitados y los no capacitados responden de una manera similar. La adición de oligomicina, un inhibidor de la OXPHOS, incrementó de manera significativa la glicólisis, lo que sugiere que estas células presentan cierta capacidad de compensación metabólica, que les permitiría mantener niveles de ATP adecuados para su funcionamiento, ante las variaciones en la disponibilidad de sustratos metabólicos. Aun así estudios previos indicaron que la oligomicina, al inhibir directamente la síntesis de ATP, produce un descenso de la motilidad espermática en diferentes especies de mamíferos (Halangk et al., 1985; Dreanno et al., 1999; Ramió-Lluch et al., 2013), al igual que otros inhibidores de esta ruta metabólica (Krzyzosiak et al., 1999; Ruiz-Pesini et al., 2000; Tourmente et al., 2015a). En la actualidad no se sabe si la OXPHOS está directamente relacionada con el proceso de capacitación de los espermatozoides pero estudios previos han determinado que especies de ratón con daños en la OXPHOS presentan una disminución del contenido de ATP y la motilidad, ocasionando problemas de infertilidad (Narisawa et al., 2002). Además diferentes estudios mostraron que la OXPHOS es necesaria para la reacción acrosómica en hámster (Rogers et al., 1977), proceso dependiente de la capacitación y necesario para que se produzca la fecundación.

El contenido de ATP encontrado en la célula espermática está relacionado tanto con el consumo como con la producción a través de las dos rutas metabólicas principales. Cabe pensar, por tanto, que debe existir un equilibrio entre estos dos procesos. Se encontró en este estudio que, una vez incubados los espermatozoides en condiciones de capacitación, el contenido de ATP de los espermatozoides era menor que el contenido de ATP de los espermatozoides incubados en estado de supervivencia. Esta diferencia puede deberse a que los espermatozoides capacitados mantienen su producción de ATP, pero presentan mayor consumo, o bien a que el consumo se mantiene estable, pero la producción de este varía. El 70 % de la energía de los espermatozoides es consumida para el mantenimiento de la motilidad (Bohmentsack y Halangk, 1986). Durante la capacitación los espermatozoides se someten a un cambio en el patrón de motilidad, denominada hiperactivación (Yanagimachi, 1970), que se caracteriza por ser un movimiento asimétrico, con alta amplitud flagelar (Yanagimachi, 1970; Suarez, 2008; Chang y Suarez, 2011; Goodson et al., 2011). Estudios previos han determinado la relación entre las vías metabólicas y su importancia en el movimiento de los espermatozoides en ratones (Tanaka et al., 2003; Miki et al., 2004; Mukai y Okuno,

2004; Ford, 2006; Takei et al., 2014), pero hasta el presente no se han examinado las diferencias que puede ocasionar la capacitación tanto en la producción como en el consumo de ATP, y que podrían influir en el contenido de ATP de los espermatozoides. Los resultados presentados en la Serie I llevaron a sugerir que la diferencia en el contenido de ATP podría estar relacionada con un aumento del consumo de energía debido a este cambio en la motilidad. Sin embargo, los resultados de esta Serie y del anterior mostraron que el consumo de ATP es similar en ambos estados del espermatozoide (capacitado y en supervivencia), y que existen diferencias en la producción de ATP según las condiciones de incubación, lo cual indicaría que las diferencias en el balance energético de las células espermáticas están más relacionadas con una disminución en la producción de ATP que con un aumento en el consumo del mismo.

La especie de ratón examinada en esta Serie (*Mus spicilegus*) presenta un nivel de competición espermática alto dentro del género *Mus*, con mayor nivel de competición espermática que *M. musculus* (examinada en la Serie anterior). Estudios previos mostraron que la producción, el consumo y el contenido de ATP de los espermatozoides está influenciado por el nivel de competición espermática que presenta la especie (Tourmente et al., 2015a; b; 2018). Como se vio en la Serie I, tanto la cinética temporal como la eficiencia de la capacitación están relacionadas con el nivel de competición espermática que presenta cada especie. Este fenómeno también podría estar vinculado a las diferencias que se observan entre el estudio con *M. musculus* (Serie II) y *M. spicilegus* (esta Serie) (Gomendio et al., 2006; Soulsbury, 2010).

La comparación de los resultados obtenidos con *M. musculus* y *M. spicilegus* muestran que los patrones de respuesta son similares en ambas especies. Sin embargo, se observaron diferencias a nivel cuantitativo, es decir, en la magnitud de dichas respuestas. La inhibición de la OXPHOS con oligomicina ocasionó una disminución del consumo de oxígeno en ambas especies, pero el aumento de la actividad de la glicólisis fue mayor en los espermatozoides de *M. musculus* y, más concretamente en los espermatozoides de *M. musculus* en condiciones de capacitación. En el caso de la estimulación del consumo de oxígeno con FCCP, *M. spicilegus* aumenta el consumo de oxígeno muy por encima de los valores obtenidos en el caso de la estimulación de la OXPHOS en *M. musculus*.

En relación con la inhibición de la glicólisis, tanto *M. musculus* como *M. spicilegus* responden a los inhibidores de esta, disminuyendo su actividad. En *M. musculus* la disminución de la actividad de la glicólisis fue drástica, mientras que en *M. spicilegus* esta disminución fue más suave.

Si bien los espermatozoides respondieron de manera similar en términos generales, la capacitación ocasionó una mayor actividad de la glicólisis. *M. musculus*, al ser una especie con una actividad glicolítica más marcada, sería capaz de responder de manera más eficiente a la inhibición de la OXPHOS. Mientras que *M. spicilegus*, al presentar

mayor tasa de OXPHOS, responde de una manera más pronunciada a los moduladores de esta ruta metabólica.

Estudios previos han observado diferencias en espermatozoides en estado de supervivencia, en los cuales se ha evidenciado que según aumenta el nivel de competición espermática de las especies de estudio, los espermatozoides son más respiratorios (Tourmente et al., 2015a). En este estudio la respuesta a la estimulación de la OXPHOS con FCCP, es mayor en la especie con mayor nivel de competición espermática. Además, al inhibir la OXPHOS, los espermatozoides de *M. musculus*, estimulan de manera más eficiente la glicólisis que en el caso de *M. spicilegus*. El proceso de capacitación necesita una mayor actividad de la glicólisis que la supervivencia. Por tanto, los espermatozoides capacitados pueden estar mejor preparados para una posible inhibición de la OXPHOS, lo que puede favorecer a especies con altas tasas glicolíticas como es el caso de *M. musculus*.

Tourmente et al. (2018) establecieron que las especies con mayor nivel de competición espermática, tienen mayor tasa de consumo de ATP. Tanto en *M. musculus* como en *M. spicilegus* la inhibición de la producción de ATP produce una rápida depleción de las reservas, llegando en tan solo 10 min a un contenido de ATP cercano a 0. Aun así *M. spicilegus*, presenta una tasa de consumo mayor, ya que, aun presentando un mayor contenido inicial de ATP en el espermatozoide, iguala los niveles observados en *M. musculus* pasados los 10 minutos de inhibición. Esta mayor tasa de consumo de ATP puede explicar la mayor velocidad de natación de *M. spicilegus*, tanto en espermatozoides no hiperactivados como hiperactivados (Serie I). La competición espermática favorece especies que presentan una mayor velocidad de natación, favoreciendo así la rapidez con la cual llegan al óvulo, sin embargo un consumo de ATP mayor, les puede ocasionar una disminución drástica de la motilidad o incluso la muerte a los espermatozoides si no encuentran los sustratos adecuados necesarios para la obtención de energía, representando un costo de la adaptación a condiciones de alta competencia.

Serie IV: Efecto de la viscosidad sobre la producción energética durante la supervivencia y la capacitación de espermatozoides de tres especies de ratón (*Mus musculus*, *Mus spretus* y *Mus spicilegus*)

La reotaxis, junto con la quimiotaxis, y en menor medida la termotaxis, son mecanismos que guían al espermatozoide hasta el lugar de fecundación. Varios estudios apoyan su importancia para la fecundación. Miki y Clapham (2013) indican que la reotaxis y la quimiotaxis son los más importantes para que el espermatozoide se mueva a lo largo del tracto genital de la hembra, relegando a la termotaxis a un segundo plano, ya que el

porcentaje de espermatozoides capacitados que responde a los gradientes de temperatura son bajos (Bahat et al., 2012).

Los espermatozoides dentro del tracto genital de la hembra, además de ser capaces de responder a los mecanismo que les guían hasta el lugar de la fecundación, deben moverse por un medio viscoelástico que varía entre 81 cP y 2.4 cP (Miki y Clapham, 2013), dependiendo de las diferentes estructuras anatómicas del tracto (Jansen, 1978; Smith et al. 2009; Miki y Clapham, 2013), en función del ciclo estral (Jansen, 1978; Gott et al. 1988) y un aumento de esa viscosidad durante el apareamiento (Miki y Clapham, 2013). Este mecanismo puede actuar con mayor intensidad cuando los espermatozoides se encuentran alejados del óvulo, donde las concentraciones de los quimioattractantes son mínimas. En el presente estudio se ha simulado un medio viscoelástico con la adición de un 2% de PVP. Este porcentaje es menor que el utilizado en el estudio de Pérez-Cerezales et al. (2016), ya que en pruebas preliminares, con una concentración del 4%, se encontró una disminución del porcentaje de espermatozoides motiles, lo que hacía inviable el estudio con esas concentraciones de PVP.

Un medio con alta viscosidad, semejante al que pueden encontrar los espermatozoides en el tracto genital de la hembra, presenta mayor resistencia para el movimiento de las células espermáticas. Esto ocasiona que cualquier movimiento que se produzca en este medio, se ralentice y se haga más lineal, independientemente del resto de condiciones (Hyakutake et al 2015). En este estudio se ha comprobado que, independientemente de la condición del espermatozoide, el movimiento en un medio viscoso es, siguiendo estas predicciones, más lento y más lineal.

Durante el proceso de capacitación, los espermatozoides desarrollan un movimiento hiperactivado que, en un medio de baja viscosidad, está caracterizado por una alta amplitud del movimiento de la cabeza, un movimiento asimétrico y una reducción de la frecuencia de batido del flagelo. La hiperactivación es esencial para la fecundación en los mamíferos (Si y Olds-Clarke, 2000; Matzuk y Lamb, 2008). Diferentes estudios han mostrado que este cambio en el tipo de movimiento favorece la natación en una solución viscosa (Jansen, 1980; Suarez et al. 1991; Suarez, 2008). Pérez-Cerezales et al. (2016) encontraron que los espermatozoides hiperactivados en un medio con alta viscosidad reducían su velocidad de natación, aumentaban su linealidad y disminuían el desplazamiento lateral de la cabeza. Estos resultados coinciden con los encontrados en este estudio. Este cambio en el movimiento implica una menor resistencia al medio viscoelástico como muestran los resultados. Los resultados de este trabajo coinciden con los encontrados en varias especies: ratón (Suarez y Dai, 1992; Miki y Clapham, 2013; Pérez-Cerezales et al., 2016), hámster (Suarez et al., 1991), de humano (Miki y Clapham, 2013) y bovino (Hyakutake et al., 2015). Además un estudio en ratones mutantes para CatSper, encontró que los espermatozoides no son capaces de hiperactivarse y por tanto no pueden nadar a través de un medio viscoelástico (Quill et al., 2003). Esto lleva a concluir que la hiperactivación es necesaria para nadar a través de un medio viscoelástico y permite que los espermatozoides se muevan de una manera más eficiente, penetrado la zona pelúcida más fácilmente.

El 70% de la energía que contienen los espermatozoides la usan para su propio movimiento (Bohnensack y Halangk, 1986). El contenido de ATP está altamente relacionado con la motilidad espermática y la frecuencia del batido flagelar (Jeulin y Soufir, 1992; Mukai y Okuno, 2004; Berlinguer et al., 2009; Goodson et al., 2012; Tourmente et al., 2013,2015b, 2018). Un estudio previo con las mismas especies empleadas en el presente estudio mostró que los espermatozoides pueden mantener concentraciones altas de ATP intracelular a lo largo del tiempo y pueden también mantener la velocidad, indicando que puede existir un balance positivo entre la producción y el consumo de ATP y que los espermatozoides podrían aumentar o disminuir la producción en función de la demanda energética (Tourmente et al., 2015b). Como ya se ha indicado, durante la capacitación los espermatozoides adquieren un movimiento hiperactivado, que no ocasiona un consumo mayor de ATP (Serie II y III). Al aumentar la viscosidad el movimiento hiperactivado se vuelve más lento, tanto a nivel progresivo como lateralmente, lo que podría estar indicando que el metabolismo del espermatozoide puede no variar independientemente del medio en el cual se encuentre. Los resultados obtenidos revelan que en dos de las especies, *M. musculus* y *M. spicilegus*, si se observan diferencias en el contenido de ATP entre un medio con baja viscosidad y otro con alta viscosidad, tanto en estado de supervivencia como en estado de capacitación. Los estudios anteriores en estas dos especies demuestran que las diferencias en el contenido de ATP entre espermatozoides no capacitados y capacitados están relacionadas con la producción de ATP y no con su consumo (*M. musculus* B6D2F1: Serie II; *M. spicilegus*: Serie III). La adición de un medio de mayor viscosidad, que resulta una mayor resistencia para el desplazamiento de los espermatozoides durante la natación, podría ocasionar un mayor consumo de ATP explicando así las diferencias encontradas en este estudio en el contenido de ATP entre espermatozoides incubados en un medio con baja viscosidad y un medio con alta viscosidad.

Si se comparan las tres especies de ratones examinadas en este estudio, se puede observar un mismo patrón de cambio en el ATP aunque con variaciones cuantitativas, siendo la especie con menor nivel de competición espermática (*M. musculus*), la que presenta un contenido de ATP menor y mostrando también que la velocidad cae más rápidamente. Tourmente et al. (2015b) establecieron que los espermatozoides que pueden mantener altas concentraciones de ATP a lo largo del tiempo, son capaces de mantener una velocidad de natación más rápida.

Los resultados obtenidos en este estudio respaldan la hipótesis planteada, según la cual los espermatozoides incubados en un medio viscoelástico cambian su patrón de movimiento, independientemente de la hiperactivación. Los espermatozoides hiperactivados en este caso no presentan más eficiencia que los espermatozoides no hiperactivados en un medio viscoelástico, pudiendo existir otro factor que favorezca la hiperactivación, no observado en este estudio.

En términos generales una de las cuestiones importantes para comprender los procesos de la reproducción en mamíferos es conocer los mecanismos de la capacitación espermática. Recientemente, los estudios sobre el proceso de capacitación se han centrado en los cambios que se producen en el espermatozoide a nivel molecular como, por ejemplo, incremento de las concentraciones de Ca^{2+} en el espermatozoide a causa de la apertura de canales para Ca^{2+} (Navarrete et al., 2015), hiperpolarización de la membrana plasmática (Zeng et al., 1995; Escoffier et al., 2012), mayor fluidez de la membrana plasmática (Harrison, 1996; Gadella y Harrison 2000), activación de la vía de señalización de AMPc/PKA (Harrison, 2004; Kraft et al., 2010), incremento de la fosforilación de proteínas con residuos de tirosina (Visconti et al., 1995; Kraft et al., 2010) y, a nivel del comportamiento celular, en la hiperactivación (Yanagimachi, 1994; Goodson et al., 2011) y la exocitosis del acrosoma (Yanagimachi, 1994; Florman et al., 2008).

Los procesos asociados a la capacitación, hiperactivación y exocitosis, junto con los procesos vinculados a la supervivencia de los espermatozoides, consumen energía en forma de ATP (Travis et al., 2001). El ATP es un recurso fundamental para el espermatozoide siendo indispensable para su movimiento. La motilidad de los espermatozoides representa aproximadamente un 70% del consumo total de ATP (Bohnsack y Halangk, 1986). Los espermatozoides de mamíferos avanzan propagando a lo largo de todo el flagelo una onda flagelar y para ello necesitan que las vías metabólicas suministren ATP de manera continua y que el ATP se distribuya a través del espermatozoide (Ford, 2006; Ruiz-Pesini et al., 2007; Storey, 2008; Cummins, 2009; du Plessis et al., 2015). Muchos estudios han revelado que existe una alta relación entre el contenido de ATP que presenta el espermatozoide y su motilidad (Jeulin y Soufir, 1992; Perchec et al., 1995; Vladic et al., 2002; Burness et al., 2004, 2005; Berlinguer et al., 2009; Goodson et al., 2012; Tourmente et al., 2013; Tourmente y Roldan, 2015). Durante el proceso de capacitación se desarrolla también un cambio en el patrón de movimiento, el proceso de hiperactivación, por el que los espermatozoides pasan a tener un tipo de movimiento más vigoroso (Yanagimachi, 1970) que parece consumir más ATP ya que, en espermatozoides de mono, el contenido de ATP disminuye en espermatozoides hiperactivados (Hung et al., 2008). En la Serie I de esta Tesis, se observó que los espermatozoides incubados en condiciones de capacitación disminuyen en mayor medida su contenido de ATP en tres especies del género *Mus*, y que dicha disminución coincide con cambios en su patrón de movimiento. Se podría inferir que este cambio en el patrón de movimiento podría ocasionar un mayor consumo de ATP, viéndose reflejado en una disminución del contenido de ATP.

En estudios subsiguientes (Series II y III) se realizó un análisis más exhaustivo del metabolismo espermático en dos especies de ratón (*Mus musculus* y *M. spicilegus*). La producción de ATP se analizó usando el consumo de oxígeno como medida de la actividad de la fosforilación oxidativa, y la acidificación del medio extracelular como indicador de la actividad glicolítica. El consumo de ATP se evaluó inhibiendo la producción del mismo y examinando cambios en su concentración intracelular en

ausencia de producción. No se apreciaron diferencias entre los espermatozoides de las dos especies de ratón estudiadas, en cuanto al consumo de ATP, cuando se incubaron en condiciones de supervivencia o de capacitación. Estos resultados descartan la teoría de que los espermatozoides capacitados presentan un mayor consumo de ATP a causa de la hiperactivación, en contraste con los resultados en espermatozoides de mono (Hung et al., 2008). A nivel de producción, los espermatozoides capacitados, tanto en *M. musculus* como en *M. spicilegus*, son más glicolíticos que los espermatozoides en estado de supervivencia. La glicólisis obtiene menor energía por molécula de sustrato que la fosforilación oxidativa (Ruiz-Pesini et al., 1998, 2000; Nakada et al., 2006). Esto podría explicar el menor contenido de ATP en los espermatozoides capacitados. Como ya se ha mencionado anteriormente, la glicólisis es esencial para la hiperactivación y la fosforilación de residuos de tirosina, imprescindibles en el proceso de capacitación (Cooper, 1984; Fraser y Quinn, 1981; Odet et al., 2013; Travis et al., 2001; Urner et al., 2001; Williams y Ford, 2001), lo que podría sugerir que la glicólisis puede activar otras rutas metabólicas no relacionadas con el ATP, y que pueden ser esenciales para el proceso de capacitación, en detrimento de la obtención de una mayor cantidad de ATP.

Además de las diferencias que se han podido encontrar entre los espermatozoides capacitados y no capacitados para cada especie, se han podido observar diferencias entre las especies estudiadas. En las tres especies el patrón de capacitación y el proceso de hiperactivación difieren. Estas diferencias podrían ser debidas al efecto de una potente fuerza evolutiva, la competición espermática. La competición espermática influye sobre rasgos anatómicos, como es el tamaño relativo de los testículos, promoviendo una mayor proporción de túbulos seminíferos (Jennions y Passmore, 1993; Gage, 1994; Briskie y Montgomerie, 1992; Stockley et al., 1997), y rasgos espermáticos, como son un mayor número de espermatozoides (Parker, 1970; Birkhead y Moller, 1998; Parker y Pizarri, 2010), mayor porcentaje de viabilidad (Torumente et al., 2015b), mayor porcentaje de motilidad (Gómez-Montoto et al., 2011a; Tourmente et al., 2015b), mayor velocidad de natación (Birkhead et al., 1999; Gage et al., 2004; Malo et al., 2005; Gasparini et al., 2010; Gomez-Montoto et al., 2011b; Tourmente et al., 2015b), cambio en las dimensiones y morfología del espermatozoide (Tourmente et al., 2015b; Varea-Sanchez et al., 2016). De la misma manera, la competición espermática puede haber sido importante en la evolución del metabolismo espermático (Tourmente et al., 2015a), así como en la cinética del proceso de capacitación. Gomendio et al. (2006) describieron la existencia de diferencias en el porcentaje de capacitación y reacción acrosómica en las tres especies estudiadas en esta Tesis, resultados que coinciden con los encontrados en el Capítulo 3. A su vez, la competición espermática también podría tener un efecto marcado sobre el proceso de hiperactivación.

En relación a las diferencias metabólicas encontradas entre los espermatozoides capacitados de *M. musculus* y *M. spicilegus*, la competición espermática también podría invocarse como una fuerza selectiva responsable de las diferencias observadas en los espermatozoides capacitados, así como sucede con la diversidad en el metabolismo durante la supervivencia (Tourmente et al., 2015a, 2018). Una comparación entre las

dos especies en respuesta a los moduladores del metabolismo, ha mostrado que los espermatozoides de *M. musculus*, la especie con niveles más bajos de competición espermática, compensan de manera menos eficiente la inhibición de la glicólisis. Esto puede estar indicando que los espermatozoides de *M. spicilegus*, especie que tiene un mayor nivel de competición espermática, presenta una respuesta más efectiva a la inhibición de la glicólisis y, con ello, a la limitación de alguno de los sustratos de la glicólisis, compensando esa falta de sustrato o inhibición con una mayor actividad de la OXPHOS. Tourmente et al. (2015a) ya indicaron que los espermatozoides de *M. musculus* en estado de supervivencia presentan una menor tasa de respiración en estado basal que los espermatozoides de *M. spicilegus*. Estas variaciones en el uso de diferentes rutas metabólicas puede afectar al contenido de ATP que presentan los espermatozoides, por tanto las especies con metabolismos espermáticos más oxidativos presentan mayor contenido de ATP en el espermatozoide (Tourmente et al., 2015a, 2018), al igual que lo encontrado en esta Tesis. Se ha demostrado que los espermatozoides de *M. spicilegus*, la especie con mayor nivel de competición espermática, presentan mayor plasticidad a la hora de responder a deficiencias de sustrato o inhibiciones de la glicólisis, estimulando más activamente la OXPHOS, traduciéndose en un mayor contenido de ATP, tanto en estado de supervivencia como en estado de capacitación. En estudios en los que se han comparado espermatozoides de homínidos (Anderson et al., 2007) y felinos (Terrel et al., 2011) se han encontrado diferencias en rasgos metabólicos, como es el potencial de membrana mitocondrial. Además, en un estudio con dos cepas de ratones de laboratorio (Odet et al., 2013) se encontraron diferencias en el consumo de glucosa y la actividad de una enzima glicolítica entre ambas cepas. Aun así, en estos estudios las diferencias en estos rasgos metabólicos no se traduce en diferencias en el contenido de ATP (Terrel et al., 2011; Odet et al., 2013).

En el Capítulo 6 se abordó la pregunta sobre cómo un medio con alta viscosidad, como el que está presente en el tracto genital de la hembra, puede afectar a los espermatozoides. Los resultados obtenidos muestran que los espermatozoides que se han sometido al proceso de hiperactivación presentan un movimiento más eficiente en un medio con alta viscosidad, resultados que apoyan los obtenidos por Perez-Cerezales et al. (2016). Aunque el movimiento hiperactivado no ocasione un mayor consumo de ATP, los espermatozoides capacitados que están incubados en un medio con alta viscosidad presentan una disminución del contenido de ATP, en comparación con los espermatozoides capacitados en un medio con baja viscosidad. Al igual que en los resultados mostrados anteriormente, en este caso también se encontraron diferencias entre las tres especies estudiadas, otra evidencia más de que la competición espermática puede influir sobre el proceso de capacitación, incluyendo la hiperactivación.

La investigación desarrollada en esta Tesis abre la puerta a futuras investigaciones relacionadas con el metabolismo espermático. Un estudio más exhaustivo sobre la glicólisis y la fosforilación oxidativa nos podría mostrar si los espermatozoides sacrifican la obtención de mayor cantidad de energía por vía oxidativa en detrimento de

la activación de la glicólisis como vía de señalización para la capacitación o si existe algún tipo de restricción por la cual los espermatozoides han de recurrir a la glicólisis para obtener más energía en determinadas condiciones. Finalmente, aunque en esta Tesis se ha prestado atención a las dos rutas metabólicas que se consideran más importantes, la fosforilación oxidativa y la glicólisis, los estudios futuros también tendrán que considerar la posibilidad de que la β -oxidación de los ácidos grasos sea una fuente de energía relevante para los espermatozoides de mamíferos. De este modo, será posible conocer en más detalle los diversos aspectos del metabolismo espermático que son determinantes importantes de la fertilidad.

Conclusiones

1. La capacitación promueve cambios en los patrones de natación y en el contenido de ATP de los espermatozoides de las tres especies de ratones del género *Mus* (*Mus musculus*, *Mus spretus* y *Mus spicilegus*). Estos cambios varían en magnitud y tiempo de una forma específica en cada especie.
2. La capacitación promueve cambios en la bioenergética de los espermatozoides de *Mus musculus* (B6D2F1) y *Mus spicilegus*. La producción de ATP por parte de las rutas metabólicas principales, glicólisis y fosforilación oxidativa, varía entre los espermatozoides no capacitados y capacitados, mientras que el consumo de ATP es similar entre ambos tratamientos.
3. Los espermatozoides de *M. musculus* (B6D2F1) y de *M. spicilegus*, incubados en condiciones no capacitantes (de supervivencia) presentan una tasa de respiración mayor que los espermatozoides capacitados, mientras que los espermatozoides capacitados presentan altas tasas glicolíticas.
4. Los cambios en la producción de ATP durante la capacitación se traduce en un menor contenido de ATP disponible en la célula espermática.
5. El patrón de movimiento hiperactivado no implica un mayor consumo de energía en forma de ATP.
6. Los espermatozoides incubados en un medio viscoelástico experimentan un cambio en el patrón de movimiento, independientemente de la hiperactivación. Presentan un movimiento más progresivo y menos lateral.
7. La exposición de los espermatozoides a un medio viscoelástico ocasiona un descenso del contenido de ATP en la célula espermática.
8. La capacitación varía en función del nivel de competición espermática que presenten las especies. Las especies con mayor nivel de competición espermática presentan un mayor porcentaje de células capacitadas e hiperactivadas, mayor producción de ATP y mayor plasticidad en la respuesta a diferentes estímulos o inhibidores de cada una de las rutas metabólicas principales.

Bibliografía

- Agnihotri SK, Agrawal AK, Hakim BH, Vishwakarma AL, Narender T, Sachan R and Sachdev M (2016) Mitochondrial membrane potential (MMP) regulates sperm motility. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal*. 52, 953-960.
- Anderson MJ, Chapman SJ, Videan EN, Evans E, Fritz J, Stoinski TS, Dixson AF, Gagneux P (2007) Functional evidence for differences in sperm competition in humans and chimpanzees. *American Journal of Physical Anthropology*. 134, 274-280.
- Arnoult C, Kazam IG, Visconti PE, Kopf GS, Villaz M, Florman HM (1999) Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *PNAS*. 96, 6757-6762.
- Austin CR (1951) Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Australian Journal of Biological Sciences*. 4, 581- 596.
- Austin CR (1952) The capacitation of mammalian sperm. *Nature*. 170, 326.
- Austin CR (1975) Membrane fusion events in fertilization. *Reproduction*. 44, 155-166.
- Austin CR, Bavister BD, Edwards RG (1973) Components of capacitation. En: Segel SJ, Crozier R, Cortman PA, Condlite PC (eds). *The regulation of mammalian reproduction*. Springfield, Ill: Charles C. Thomas, 247-254.
- Baccetti B (1985) Evolutionary trends in sperm structure. *Comparative Biochemistry and Physiology. Molecular and Integrative Physiology*. 85, 29-36.
- Bahat A, Caplan SR, Eisenbach M (2012) Thermotaxis of human sperm cells in extraordinarily shallow temperature gradients over a wide range. *PLoS ONE*. 7, e41915.
- Bahat A, Tur-Kaspa I, Gakamsky A, Giojalas LC, Breitbart H, Eisenbach M (2003) Thermotaxis of mammalian sperm cells: a potential navigation mechanism in the female genital tract. *Nature Medicine*. 9, 149-150.
- Bailey JL, Storey BT (1994) Calcium influx into mouse spermatozoa activated by solubilized mouse zona pellucida, monitored with the calcium fluorescent indicator, fluo-3. inhibition of the influx by three inhibitors of the zona pellucida induced acrosome reaction: Tyrphostin A48, pertussis toxin, and 3-quinuclidinyl benzilate. *Molecular Reproduction and Development*. 39, 297-308.
- Baker MA, Hetherington L, Aitken RJ (2006) Identification of SRC as a key PKA-stimulated tyrosine kinase involved in the capacitation-associated hyperactivation of murine spermatozoa. *Journal of Cell Science*. 119, 3182-3192.
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*. 67, 1-48.
- Bavister BD (1973) Capacitation of hamster spermatozoa during incubation in culture medium. *Reproduction*. 35, 161-163.
- Bedford JM (1970) Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction*. Suppl. 2, 128-158.
- Berlinguer F, Madeddu M, Paciu V, Succu S, Spezzigu A, Satta V, Mereu P, Leoni GG, Naitana S (2009) Semen molecular and cellular features: these parameters can reliably predict subsequent ART outcome in a goat model. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 7, 125.

- Birkhead TR, Martinez JG, Burke T, Froman DP (1999) Sperm mobility determines the outcome of sperm competition in the domestic fowl. *Proceedings of the Royal Society of London*. 266, 1759-1764.
- Birkhead TR, Moller AP (1998) Sperm competition and sexual selection. Academic Press.
- Bleil JD, Wassarman PM (1983) Sperm-Egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zone pellucida glycoprotein. *Development Biology*. 95, 317-324.
- Blengini CS, Teves ME, Uñates DR, Guidobaldi HA, Gatica LV, Giojalas LC. (2011) Human sperm pattern of movement during chemotactic re-orientation towards a progesterone source. *Asian Journal of Andrology*. 13, 769-773.
- Boatman DE, Robbins RS (1991) Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility and acrosome reaction. *Biology of Reproduction*. 44, 806-813.
- Bohnensack R, Halangk W (1986) Control of respiration and of motility in ejaculated bull spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 850, 72-79.
- Borg CL, Wolski KM, Gibbs GM, O'Bryan MK (2010) Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a "non-performer". *Human Reproduction Update*. 16, 205-224.
- Boryshpolets S, Pérez-Cerezales S, Eisenbach M (2015) Behavioral mechanism of human sperm in thermotaxis: a role for hyperactivation. *Human Reproduction*. 30, 884-892.
- Briskie JV, Montgomerie R (1992) Sperm size and sperm competition in birds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Science*. 247, 89-95.
- Briskie JV, Montgomerie R, Birkhead TR (1997) The evolution of sperm size in birds. *Evolution*. 51, 937-945.
- Buffone MG, Rodriguez-Miranda E, Storey BT, Gerton GL (2009) Acrosomal exocytosis of mouse sperm progresses in a consistent direction in response to zona pellucida. *Journal of Cellular Physiology*. 220, 611-620.
- Bunch DO, Welch JE, Magyar PL, Eddy EM, O'Brien DA (1998) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S protein distribution during mouse spermatogenesis. *Biology of Reproduction*. 58, 834-841.
- Burgos C, Maldonado C, Gerez de Burgos NM, Aoki A and Blanco A (1995) Intracellular localization of the testicular and sperm-specific lactate dehydrogenase isozyme C4 in mice. *Biology of Reproduction*. 53, 84-92.
- Burness G, Casselman SJ, Schulte-Hostedde AI, Moyes CD, Montgomerie R (2004) Sperm swimming speed and energetics vary with sperm competition risk in bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 56, 65-70.
- Burness G, Moyes CD, Montgomerie R (2005) Motility, ATP levels and metabolic enzyme activity of sperm from bluegill (*Lepomis macrochirus*) *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 140, 11-17.
- Cancel AM, Lobdell D, Mendola P, Perreault SD (2000) Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. *Human Reproduction*. 15, 1322-1328.

- Canty A, Ripley B (2017) boot: bootstrap R (S-plus) functions. R package version 1.3-20.
- Cazaux B, Catalan J, Justy F, Escudé C, Desmarais E, Brirron-Davidiam J (2013) Evolution of the structure and composition of house mouse satellite DNA sequences in the subgenus *Mus* (Rodentia: Muridae): a cytogenomic approach. *Chromosoma*. 122, 209-220.
- Chang MC (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the Fallopian tubes. *Nature*. 168, 697-698.
- Chang MC (1955) Development of fertilizing capacity of rabbit spermatozoa in the uterus. *Nature*. 175, 1036-1037.
- Chang MC (1984) The meaning of sperm capacitation. *Journal of Andrology*. 5, 45-50.
- Chang H, Suarez SS (2011) Two distinct Ca^{2+} signalling pathways modulate sperm flagellar beating patterns in mice. *Biology of Reproduction*. 85, 296-305.
- Chang H, Kim BJ, Kim YS, Suarez SS, Wu M (2013) Different migration patterns of sea urchin and mouse sperm revealed by a microfluidic chemotaxis device. *PLoS ONE*. 8, e60587.
- Cohen-Dayag A, Tur-Kaspa I, Dor J, Mashiach S, Eisenbach M (1995) Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *PNAS*. 92, 11039-11043.
- Cooper TG (1984) The onset and maintenance of hyperactivated motility of spermatozoa from the mouse. *Gamete Research* 9, 55-74.
- Cummins JM (2009) Sperm motility and energetics. En: Birkhead TR, Hosken DJ, Pitnick S (eds), *Sperm biology, an evolutionary perspective*. San Diego, CA: Academic Press, 185-206.
- Danshina PV, Geyer CB, Dai Q, Goulding EH, Willis WD, Kitto GB, McCarrey JR, Eddy EM and O'Brien DA (2010) Phosphoglycerate kinase 2 (PGK2) is essential for sperm function and male fertility in mice. *Biology of Reproduction*. 82, 136-145.
- Darwin, C (1871) *The descent of man, and selection in relation to sex*. London: John Murray.
- deLamirande E, Leclerc P, Gagnon C (1997) Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Molecular Human Reproduction*. 3, 175-194.
- Demarco IA, Espinoza F, Edwards J, Sosnik J, De la Vega-Beltrán JL, Hockensmith JW, Kopf GS, Darszon A, Visconti PE (2003) Involvement of a $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter in mouse sperm capacitation. *Journal of Biological Chemistry*. 278, 7001-7009.
- Dreanno C, Cosson J, Suquet M, Seguin F, Dorange G and Billard R (1999) Nucleotide content, oxidative phosphorylation, morphology, and fertilizing capacity of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa during the motility period. *Molecular Reproduction and Development*. 53, 230-243.
- du Plessis SS, Agarwal A, Mohanty G, Van der Linde M (2015) Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use? *Asian Journal of Andrology*. 17, 230-235.
- Escoffier J, Krapf D, Navarrete F, Darszon A, Visconti PE (2012) Flow cytometry analyses reveals a decrease in intracellular sodium during sperm capacitation. *Journal of Cell Science*. 125, 473-485.

- Everse J, Kaplan NO (1973) Lactate dehydrogenases: structure and function. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 37, 61-133.
- Fabro G, Rovasio RA, Civalero S, Frenkel A, Caplan SR, Eisenbach M, Giojalas LC (2002) Chemotaxis of capacitated rabbit spermatozoa to fluid revealed by a novel directionality-based assay. *Biology of Reproduction*. 67, 1565-1571.
- Ferramosca A, Provenzano SP, Coppola L and Zara V (2012) Mitochondrial respiratory efficiency is positively correlated with human sperm motility. *Urology*. 79, 809-814.
- Florman HM, Jungnickel MK, Sutton KA (2008) Regulating the acrosome reaction. *International Journal of Developmental Biology*. 52, 503-510.
- Florman HM, Storey BT (1982) Mouse gamete interactions: the zone pellucida is the side of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. *Development Biology*. 91, 121-130.
- Ford WCL (2006) Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Human Reproduction Update*. 12, 269-274.
- Fraser LR (1977) Motility patterns in mouse spermatozoa before and after capacitation. *Journal of Experimental Zoology*. 202, 439-444.
- Fraser LR (1982) Ca^{2+} is required for mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. *Journal of Andrology*. 3, 412-419.
- Fraser LR (1983) Potassium ions modulate expression of mouse sperm fertilizing ability, acrosome reaction and hyperactivated motility in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*. 69, 539-553.
- Fraser LR (1987) Strontium supports capacitation and the acrosome reaction in mouse sperm and rapidly activates mouse eggs. *Gamete Research*. 18, 363-374.
- Fraser LR (2010) The “switching on” of mammalian spermatozoa: molecular events involved in promotion and regulation of capacitation. *Molecular Reproduction and Development*. 77, 197-208.
- Fraser LR, Herod JE (1990) Expression of capacitation-dependent changes in chlortetracycline fluorescence patterns in mouse spermatozoa requires a suitable glycolysable substrate. *Journal of Reproduction and Fertility*. 88, 611-621.
- Fraser LR, Quinn PJ (1981) A glycolytic product is obligatory for initiation of the sperm acrosome reaction and whiplash motility required for fertilization in the mouse. *Journal of Reproduction and Fertility*. 61, 25-35.
- Gadella BM, Harrison RAP (2000) The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behaviour in the sperm plasma membrane. *Development*. 127, 2407-2420.
- Gadella BM, Harrison RAP (2002) Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biology of Reproduction*. 67, 340-350.
- Gage MJG (1994) Associations between body size, mating pattern, testis size and sperm lengths across butterflies. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 258, 247-254.

- Gage MJG, Macfarlane CP, Yeates S, Ward RG, Searle JB, Parker GA (2004) Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic salmon. *Current Biology*. 14, 44–47.
- Gakamsky A, Armon L, Eisenbach M (2009) Behavioral response of human spermatozoa to a concentration jump of chemoattractants or intracellular cyclic nucleotides. *Human Reproduction*. 24, 1152-1163.
- Gardner DK, Leese HJ (1990) Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*. 88, 361-368.
- Garty NB, Galiani D, Aharonheim A, Ho YK, Phillips DM, Dekel N, Salomon Y (1988) G-proteins in mammalian gametes: an immunocytochemical study. *Journal of Cell Science*. 91, 21-31.
- Gasparini C, Simmons LW, Beveridge M, Evans JP (2010) Sperm swimming velocity predicts competitive fertilization success in the green swordtail *Xiphophorus helleri*. *PLoS ONE*. 5, e12146.
- Gervasi MG, Visconti PE (2016) Chang's meaning of capacitation: a molecular perspective. *Molecular Reproduction and Development*. 83, 860-874.
- Giojalas LC, Rovasio RA, Fabro G, Gakamsky A, Eisenbach M (2004) Timing of sperm capacitation appears to be programmed according to egg availability in the female genital tract. *Fertility and Sterility*. 82, 247-249.
- Giojalas LC, Guidobaldi HA, Sanchez R (2015) Sperm chemotaxis in mammals. En: Cosson J, editor. *Flagellar mechanics and sperm guidance*. Bentam science publishers, República Checa. Pag. 272-307.
- Gomendio M, Harcourd AH, Roldan ERS (1998) Sperm competition in mammals. En: Birkhead TR, Moller AP, Editores. *Sperm competition and sexual selection*. Academic Press, San Diego. Pag. 667-755.
- Gomendio M, Martin-Coello J, Crespo C, Magaña C, Roldan ERS (2006) Sperm competition enhances functional capacity of mammalian spermatozoa. *PNAS*. 103, 15113-15117.
- Gomendio M, Roldan ERS (2008) Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. *International Journal of Development*. 52, 439–447
- Gómez-Montoto L, Magaña C, Tourmente M, Martín-Coello J, Crespo C, Luque-Larena JJ, Gomendio M and Roldan ERS (2011a) Sperm competition, sperm numbers and sperm quality in muroid rodents. *PLoS One*. 6, e18173.
- Gómez-Montoto L, Varea-Sánchez M, Tourmente M, Martín-Coello J, Luque-Larena JJ, Gomendio M and Roldan ERS (2011b) Sperm competition differentially affects swimming velocity and size of spermatozoa from closely related muroid rodents: head first. *Reproduction*. 142, 819-830.
- Goodson SG, Qiu Y, Sutton KA, Xie G, Jia W, O'Brien DA (2012) Metabolic substrates exhibit differential effects on functional parameters of mouse sperm capacitation. *Biology of Reproduction*. 87, 1-15.
- Goodson SG, Zhang Z, Tsuruta JK, Wang W, O'Brien DA (2011) Classification of mouse sperm motility patterns using an automated multiclass support vector machines model. *Biology of Reproduction*. 84, 1207-1215.

- Gott AL, Gray SM, James AF, Leese HJ (1988) The mechanism and control of rabbit oviduct fluid formation. *Biology of Reproduction*. 39, 758-763.
- Guidobaldi HA, Hirohashi N, Cubilla M, Buffone MG, Giojalas LC (2017) An intact acrosome is required for the chemotactic response to progesterone in mouse spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*. 84, 310-315.
- Gwatkin RBL (1976) Fertilization. En: Poste G y Nicolson GL, Editores. *The cell Surface in embryogenesis and development*. Norte de Holanda, Amsterdam. Pag. 1-54.
- Gwatkin RBL (1977) *Fertilization mechanisms in man and mammals*. Plenum Press, Nueva York.
- Halangk W, Bohnensack R, Frank K and Kunz W (1985) Effect of various substrates on mitochondrial and cellular energy state of intact spermatozoa. *Biomedica Biochimica Acta*. 44, 411-420.
- Harper CV, Barrat CLR, Publicover SJ, Kirkman-Brown JC (2006) Kinetics of the progesterone-induced acrosome reaction and its relation to intracellular calcium responses in individual human spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 75, 933-939.
- Harris SE, Gopichandran N, Picton HM, Leese HJ, Orsi NM (2005) Nutrient concentrations in murine follicular fluid and the female reproductive tract. *Theriogenology*. 64, 992-1006.
- Harrison RAP (1996) Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reproduction, Fertility and Development*. 8, 581-594.
- Harrison RAP (2004) Rapid PKA-Catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate. *Molecular Reproduction and Development*. 67, 337-352.
- Harrison RAP, Gadella BM (2005) Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology*. 63, 342-351.
- Harrison RAP, Miller NGA (2000) cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. *Molecular Reproduction and Development*. 55, 220-228.
- Hino T, Muro Y, Tamura-Nakano M, Okabe M, Tateno H, Yanagimachi R (2016) The behavior and acrosomal status of mouse spermatozoa in vitro, and within the oviduct during fertilization after natural mating. *Biology of Reproduction*. 95, 1-11.
- Ho HC, Suarez SS (2001) Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction*. 122, 519-526.
- Holman L, Freckleton RP, Snook RR (2008) What use is an infertile sperm? A comparative study of sperm-heretomorphic *Drosophila*. *Evolution*. 62, 374-385.
- Hoppe PC (1976) Glucose requirement for mouse sperm capacitation in vitro. *Biology of Reproduction*. 15, 39-45.
- Hung P, Miller MG, Meyers SA, VandeVoort CA (2008) Sperm mitochondrial integrity is not required for hyperactivated motility, zona binding or acrosome in the rhesus macaque. *Biology of Reproduction*. 79, 367-375.
- Hyakutake T, Suzuki H, Yamamoto S (2015) Effect of non-Newtonian fluid properties on bovine sperm motility. *Journal of Biomechanics*. 48, 2941-2947.

- Ignotz GG, Suarez SS (2005) Calcium/calmodulin and calmodulin kinase II stimulate hyperactivation in demembrated bovine sperm. *Biology of Reproduction*. 73, 519-526.
- Ishijima S (2011) Dynamics of flagellar force generated by a hyperactivated spermatozoon. *Reproduction*. 142, 409-415.
- Jansen RPS (1978) Fallopian tube isthmus mucus and ovum transport. *Science*. 201, 349-351.
- Jansen RPS (1980) Cyclic changes in the human fallopian tube isthmus and their functional importance. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 136, 292-308.
- Jennions MD, Passmore NI (1993) Sperm competition in frogs: testis size and “sterile male” experiment on *Chiromantis xerampelina* (Rhacophoridae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 50, 211-220.
- Jeulin C, Soufir JC (1992) Reversible intracellular ATP changes in intact rat spermatozoa and effects on flagellar sperm movement. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 21, 210-222.
- Jin JY, Chen WY, Zhou CX, Chen ZH, Yu-Ying Y, Ni Y, Chan HC, Shi QX (2009) Activation of GABAA receptor/Cl⁻ channel and capacitation in rat spermatozoa: HCO₃⁻ and Cl⁻ are essential. *Systems Biology in Reproduction Medicine*. 55, 97-108.
- Jin JY, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, Chiba K, Hirohashi N (2011) Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zone pellucida during in vitro fertilization. *PNAS*. 108, 4892-4896.
- Johnson AR, Graciunescu CN, Guo Z, Teng YW, Thresher RJ, Blusztajn JK and Zeisel SH (2010) Deletion of murine choline dehydrogenase results in diminished sperm motility. *The FASEB Journal*. 24, 2752-2761.
- Johnson MH (1975) The macromolecular organization of membranes and its bearing on events leading up to fertilization. *Reproduction*. 44, 155-166.
- Jungnickel MK, Marrero H, Birnbaumer L, Lemos JR, Florman HM (2001) Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nature Cell Biology*. 3, 499-502.
- Kaldis P, Stolz M, Wyss M, Zanolla E, Rothen-Rurishauser B, Vorherr T, Walimann T (1996) Identification of two distinctly localized mitochondrial creatine kinase isoenzymes in spermatozoa. *Journal of Cell Science*. 109, 2079-2088.
- Kantsler V, Dunkel J, Blayney M, Goldstein RE (2014) Rheotaxis facilitates upstream navigation of mammalian sperm cells. *eLife*. 3, e02403.
- Krapf D, Arcelay E, Wertheimer EV, Sanjay A, Pilder SH, Salicioni AM, Visconti PE (2010) Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signalling in the presence of Src kinase inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*. 285, 7977-7985.
- Krzyzosiak J, Molan P, Vishwanath R (1999) Measurements of bovine sperm velocities under true anaerobic and aerobic conditions. *Animal Reproduction Science*. 55, 163-173.
- La Spina FA, Puga Molina LC, Romarowski A, Vitale AM, Falzone TL, Krapf D, Hirohashi N, Buffone MG (2016) Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct. *Development Biology*. 411, 172-182.
- Lee MA, Storey BT (1986) Bicarbonate is essential for fertilization of mouse eggs: mouse sperm require it to undergo the acrosome reaction. *Biology of Reproduction*. 34, 349-356.

- Lenth R (2019) emmeans: estimated marginal means, aka least-square means. R package version 1.3.3.
- Lüke L, Tourmente M and Roldan ERS (2015) Sexual selection of protamine 1 in mammals. *Molecular Biology and Evolution*. 33, 174-184.
- Lüke L, Vicens A, Tourmente M and Roldan ERS (2014) Evolution of protamine genes and changes in sperm head phenotype in rodents. *Biology of Reproduction*. 90, 1-8.
- Magaña C (2004) Evolución de los caracteres reproductivos: un estudio comparativo entre especies del género *Mus*. Tesis Doctoral, Universidad Complutense, Madrid.
- Malo AF, Garde JJ, Soler AJ, Garcia AJ, Gomendio M, Roldan ERS (2005) Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 72, 822-829.
- Martin-Coello J (2008) Papel de la competición espermática en la evolución de proteínas reproductivas y de reconocimiento gamético en mamíferos. Tesis doctoral, Universidad Complutense, Madrid.
- Matzuk MM and Lamb DJ (2008) The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature Medicine*. 14, 1197-1213.
- Miki K, Clapham DE (2013) Rheotaxis guides mammalian sperm. *Current Biology*. 23, 443-452.
- Miki K (2007) Energy metabolism and sperm function. En Roldan ERS, Gomendio M, Editores. *Spermatology*. Nottingham University Press, Nottingham. Pag. 309-325.
- Miki K, Qu W, Goulding EH, Willis WD, Bunch DO, Strader LF, Perreault SD, Eddy EM, O'Brien DA (2004) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *PNAS*. 101, 16501-16506.
- Minder AM, Hosken DJ, Ward PI (2005) Co-evolution of male and female reproductive characters across the Scathiohagidae (Diptera). *Journal of Evolutionary biology*. 18, 60-69.
- Mukai C, Okuno M (2004) Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biology of Reproduction*. 71, 540-547.
- Munoz-Garay C, De la Vega-Beltrán JL, Delgado R, Labarca P, Feliz R, Darszon A (2001) Inwardly rectifying K⁺ channels in spermatogenic cells: functional expression and implication in sperm capacitation. *Development Biology*. 234, 261-274.
- Murase T, Roldan ERS (1996) Progesterone and the zona pellucida activate different transducing pathways in the sequence of events leading to diacylglycerol generation during mouse sperm acrosomal exocytosis. *Biochemical Journal*. 320, 1017-1023.
- Nakada K, Sato A, Yoshida K, Morita T, Tanaka H, Inoue SI, Yonekawa H, Hayashi JI (2006) Mitochondria-related male infertility. *PNAS*. 103, 15148-15153.
- Narisawa S, Hecht NB, Goldberg E, Boatright KM, Reed JC, Millan JL (2002) Testis-specific cytochrome c-Null mice produce functional sperm but undergo early testicular atrophy. *Molecular and Cellular Biology*. 22, 5554-5562.

- Navarrete FA, García-Vázquez FA, Alvau A, Escoffier J, Krapf D, Sánchez-Cardenas C, Salicioni AM, Darszon A, Visconti PE (2015) Biphasic role of calcium in mouse sperm capacitation signalling pathways. *Journal of Cellular Physiology*. 230, 1758-1769.
- Nevo AC, Rikmenspoel R (1970) Diffusion of ATP in sperm flagella. *Journal of Theoretical Biology*. 26, 11-18.
- Nolan JP, Hammerstedt RH (1997) Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *The FASEB Journal*. 11, 670-682.
- O'Toole CMB, Arnoult C, Darszon A, Steinhardt RA, Florman HM (2000) Ca²⁺ entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Molecular Biology of the Cell*. 11, 1571-1584.
- Odet F, Duan C, Willis WD, Goulding EH, Kung A, Eddy EM and Goldberg E (2008) Expression of the gene for mouse lactate dehydrogenase C (*Ldhc*) is required for male fertility. *Biology of Reproduction*. 79, 26-34.
- Odet F, Gabel S, London RE, Goldberg E, Eddy EM (2013) Glycolysis and mitochondrial respiration in mouse LDHC-Null sperm. *Biology of Reproduction*. 88, 1-7.
- Odet F, Gabel SA, Williams J, London RE, Goldberg E, Eddy EM (2011) Lactate dehydrogenase C and energy metabolism in mouse sperm. *Biology of Reproduction*. 85, 556-564.
- Okamura N, Tajima Y, Soejuma A, Masuda H, Sugita Y (1985) Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry*. 260, 9699-9705.
- Oliveira RG, Tomasi L, Rovasio RA, Giojalas LC (1999) Increased velocity and induction of chemotactic response in mouse spermatozoa by follicular and oviductal fluids. *Journal of Reproduction and Fertility*. 115, 23-27.
- Olds-Clarke P (1989) Sperm from *tw32/+* mice: capacitation is normal, but hyperactivation is premature and nonhyperactivated sperm are slow. *Development Biology*. 131, 475-482.
- Panneerdoss S, Siva AB, Kameshwari DB, Rangaraj N, Shivaji S (2012) Association of lactate, intracellular pH, and intracellular calcium during capacitation and acrosome reaction: contribution of hamster sperm dihydrolipoamide dehydrogenase, the E3 subunit of pyruvate dehydrogenase complex. *Journal of Andrology*. 33, 699-710.
- Paoli D, Gallo M, Rizzo F, Baldi E, Francavilla S, Lenzi A, Lombardo F, Gandini L (2011) Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. *Fertility and Sterility*. 95, 2315-2319.
- Parker GA (1970) Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews*. 45, 525-567.
- Parker GA (1982) Why are there so many tiny sperm? Sperm competition and the maintenance of two sexes. *Journal of Theoretical Biology*. 96, 281-294.
- Parker GA, Pizarri T (2010) Sperm competition and ejaculate economics. *Biological Reviews*. 85, 897-934.
- Partridge RJ, Leese HJ (1996) Consumption of amino acids by bovine preimplantation embryos. *Reproduction, Fertility and Development*. 8, 945-950.

- Passarella S, de Bari L, Valenti D, Pizzuto R, Paventi G, Atlante A (2008) Mitochondria and L-lactate metabolism. *FEBS Letters*. 582, 3569-3576.
- Perchec G, Jeulin C, Cosson J, Billard R (1995) Relation between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *Journal of Cell Science*. 108, 747-753.
- Perez-Cerezales S, López-Cardona AP, Gutiérrez-Adán A (2016) Progesterone effects on mouse sperm kinetics in conditions of viscosity. *Reproduction*. 151, 501-507.
- Pitnick S, Miller GT, Schneider, Km Markow TA (2003) Ejaculate-female coevolution in *Drosophila majovensis*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 270, 1507-1512.
- Presgraves DC, Baker RH, Wilkinson GS (1999) Coevolution of sperm and female reproductive tract morphology in stalk-eyed flies. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 266, 1041-1047.
- Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE, Garbers DL (2003) Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *PNAS*. 100, 14869-14874.
- Ramió-Lluch L, Yeste M, Fernández-Novell JM, Estrada E, Rocha L, Cebrián-Pérez JA, Muñio-Blanco T, Concha II, Ramírez A, Rodríguez-Gil JE (2013) Oligomycin A-induced inhibition of mitochondrial ATP-synthase activity suppresses boar sperm motility and in vitro capacitation achievement without modifying overall sperm energy levels. *Reproduction, Fertility and Development*. 26, 883-897.
- Robertson L, Wolf DP, Tash JS (1988) Temporal changes in motility parameters related to acrosomal status: identification and characterization of populations of hyperactivated human sperm. *Biology of Reproduction*. 39, 797-805.
- Rogers BJ, Ueno M, Yanagimachi R (1977) Inhibition of hamster sperm acrosome reaction and fertilization by oligomycin, antimycin A and rotenone. *Journal of Experimental Zoology*. 199, 129-135.
- Roldan ERS, Murase T, Shi QX (1994) Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zone pellucida. *Science*. 266, 1578-1581.
- Ruiz-Pesini E, Diaz C, Lapeña AC, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Arenas J, Lopez-Perez MJ (1998) Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clinical Chemistry*. 44, 1616-1620.
- Ruiz-Pesini E, Diaz-Sanchez C, Lopez-Perez MJ, Enriquez JA (2007) The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process? *Current Topics in Developmental Biology*. 77, 3-19.
- Ruiz-Pesini E, Lapeña AC, Díaz-Sánchez C, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Díaz M, Urriés A, Montoro L, López-Pérez MJ, Enríquez JA (2000) Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *American Society of Human Genetics*. 67, 682-696.
- Sabeur K, Meizel S (1995) Importance of bicarbonate to the progesterone-initiated human sperm acrosome reaction. *Journal of Andrology*. 16, 266-271.

- Schlingmann K, Michaut MA, Mcelwee JL, Wolff CA, Traves AJ, Turner RM (2007) Calmodulin and CaMKII in the sperm principal piece: evidence for a motility-related calcium/calmodulin pathway. *Journal of Andrology*. 28, 706-716.
- Schönfeld P, Wojtczak L (2008) Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*. 45, 231-241.
- Scott, MA (2000) A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *Animal Reproduction Science*. 60, 337–348.
- Shams-Borhan G, Harrison RAP (1981) Production, characterization, and use of ionophore-induced, calcium-dependent acrosome reaction in ram spermatozoa. *Gamete Research*. 4, 407-432.
- Shi QX, Roldan ERS (1995) Bicarbonate/CO₂ is not required for zona pellucida- or progesterone- induced acrosomal exocytosis of mouse spermatozoa but is essential for capacitation. *Biology of Reproduction*. 52, 540-546.
- Si Y, Olds-Clarke P (2000) Evidence for the involvement of calmodulin in mouse sperm capacitation. *Biology of Reproduction*. 62, 1231-1239.
- Smith DJ, Gaffnet EA, Gadella H, Kapur N, Kirkman-Brown (2009) Bend propagation in the flagella of migrating human sperm, and its modulation by viscosity. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 66, 220-236.
- Soulsbury CD (2010) Genetic patterns of paternity and testes size in mammals. *PLoS One*. 5, e9581.
- Spehr M, Schwane K, Riffell JA, Barbour J, Zimmer RK, Neuhaus EM, Hatt H (2004) Particulate adenylyl cyclase plays a key role in human sperm olfactory receptor-mediated chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*. 279, 40194-40203.
- Stauss CR, Votta TJ, Suarez SS (1995) Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zone pellucida. *Biology of Reproduction*. 53, 1280-1285.
- Stockley P, Gage JG, Parker GA, Moller AP (1997) Sperm competition in fishes: the evolution of testis size and ejaculate characteristics. *American Naturalist*. 149, 933-954.
- Storey BT (2008) Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe.
- Suarez SS (1996) Hyperactivated motility in sperm. *Journal of Andrology*. 17, 331-335.
- Suarez SS (2008) Control of hyperactivation in sperm. *Human Reproduction Update*. 14, 647-657.
- Suarez SS, Dai X (1992) Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biology of Reproduction*. 46, 686-691.
- Suarez SS, Katz DF, Owen DH, Andrew JB, Powell RL (1991) Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biology of Reproduction*. 44, 375-381.
- Suzuki H, Nunome M, Kinoshita G, Aplin KP, Vogel P, Kryukov AP, Jin ML, Han SH, Maryanto I, Tsuchiya K, Ikeda H, Shiroishi T, Yonekawa H, Moriwaki K (2013) Evolutionary and dispersal history of eurasian house mice *Mus musculus* clarified by more extensive geographic sampling of mitochondrial DNA. *Heredity*. 111, 375-390.
- Takao D, Kamimura S (2008) FRAP analysis of molecular diffusion inside sea-urchin spermatozoa. *Journal of Experimental Biology*. 211, 3594-3600.

- Takei GL, Miyashiro C, Okuno M (2014) Glycolysis plays an important role in energy transfer from the base to the distal end of the flagellum in mouse sperm. *Journal of Experimental Biology*. 217, 1876-1886.
- Tamuli MK, Watson PF (1994) Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. *Animal Reproduction Science*. 35, 247-254.
- Tanaka H, Iguachi N, Miyagawa Y, Koga M, Kohroki J and Nishimune Y (2003) Differential expression of succinyl CoA transferase (SCOT) genes in somatic and germline cells of the mouse testis. *International Journal of Andrology*. 26, 52-56.
- Tanaka H, Takahashi T, Iguchi N, Kitamura K, Miyagawa Y, Tsujimura A, Matsumiya K, Okuyama A, Nishimune Y (2004) Ketone bodies could support the motility but not the acrosome reaction of mouse sperm. *International Journal of Andrology*. 27, 172-177.
- Tang H, Duan C, Bleher R and Goldberg E (2013) Human lactate dehydrogenase A (LDHA) rescues mouse *Ldhc*-Null sperm function. *Biology of Reproduction*. 88, 1-6.
- Terrell KA, Wildt DE, Anthony NM, Bavister BD, Leibo SP, Penfold LM, Marker LL and Crosier AE (2011) Oxidative phosphorylation is essential for felid sperm function, but is substantially lower in cheetah (*Acinonyx jubatus*) compared to domestic cat (*Felis catus*) ejaculate. *Biology of Reproduction*. 85, 473-481.
- Tombes RM, Shapiro BM (1985) Metabolite channeling: a phosphorylcreatine shuttle to mediate high energy phosphate transport between sperm mitochondrion and tail. *Cell*. 41, 325-334.
- Tourmente M, Gomendio M, Roldan ERS (2011) Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. *BMC Evolutionary Biology*. 11, 1-10.
- Tourmente M, Rowe M, Gonzalez-Barroso MM, Rial E, Gomendio M, Roldan ERS (2013) Postcopulatory sexual selection increases ATP content in rodent spermatozoa. *Evolution*. 67, 1838-1846.
- Tourmente M, Varea-Sanchez M, Roldan ERS (2018) Faster and more efficient swimming: energy consumption of murine spermatozoa under sperm competition. *Biology of Reproduction*. 100, 420-428.
- Tourmente M, Villar-Moya P, Rial E, Roldan ERS (2015a) Differences in ATP generation via glycolysis and oxidative phosphorylation, and relationships with sperm motility, in mouse species. *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*. 290, 20613-20626.
- Tourmente M, Villar-Moya P, Varea-Sanchez M, Luque-Larena JJ, Rial E, Roldan ERS (2015b) Performance of rodent spermatozoa over time is enhanced by increased ATP concentrations: the role of sperm competition. *Biology of Reproduction*. 93, 1-13.
- Travis AJ, Foster JA, Rosenbaum NA, Visconti PE, Gerton GL, Kopf GS, Moss SB (1998) Targeting of a germ cell-specific type 1 hexokinase lacking a porin-binding domain to the mitochondria as well as to the head and fibrous sheath of murine spermatozoa. *Molecular Biology of the Cell*. 9, 263-276.
- Travis AJ, Jorgez CJ, Merdiushev T, Jones BH, Dess DM, Diaz-Cueto L, Storey BT, Kopf GS and Moss SB (2001) Functional relationships between capacitation-dependent cell signalling and compartmentalized metabolic pathways in murine spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry*. 276, 7630-7636.

- Travis AJ, Tutuncu L, Jorgez CJ, Ord TS, Jones BH, Kopf GS, Williams CJ (2004) Requirements for glucose beyond sperm capacitation during in vitro fertilization in the mouse. *Biology of Reproduction*. 71, 139-145.
- Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly-Y M, Gidlöf S, Oldfors A, Wibom R, Törnell J, Jacobs HT, Larsson NG (2004) Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*. 429, 417-423.
- Turner RM (2006) Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, Fertility and Development*. 18, 25-38.
- Urner F, Sakkas D (1996) Glucose is not essential for the occurrence of sperm binding and zona pellucida-induced acrosome reaction in the mouse. *International Journal of Andrology*. 19, 91-96.
- Urner F, Leppens-Luisier G, Sakkas D (2001) Protein tyrosine phosphorylation in sperm during gamete interaction in the mouse: the influence of glucose. *Biology of Reproduction*. 64, 1350-1357.
- Uto N, Yoshimatsu N, Lapata A, Yanagimachi R (1988) Zona-induced acrosome reaction of hamster spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology*, 248, 113-120.
- Vacquier VD, Moy GW (1977) Isolation of bindin: the protein responsible for adhesion of sperm to sea urchin eggs. *PNAS*. 74, 2456-2460.
- Varea-Sanchez M, Gómez-Montoto L, Tourmente M, Roldan ERS (2014) Postcopulatory sexual selection results in spermatozoa with more uniform head and flagellum sizes in rodents. *PLoS ONE*. 9, e108148.
- Varea-Sanchez M, Tourmente M, Bastir M, Roldan ERS (2016) Unraveling the sperm blueprint: relationships between sperm head morphology and sperm function in rodents. *Biology of Reproduction*. 95, 1-9.
- Vigil P, Toro A, Godoy A (2007) Physiological action of oestradiol on the acrosome reaction in human spermatozoa. *Andrologia*. 40, 146-151.
- Visconti PE (2009) Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *PNAS*. 106, 667-668.
- Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS (1995) Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*. 121, 1129-1137.
- Visconti PE, Kopf GS (1998) Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biology of Reproduction*. 59, 1-6.
- Visconti PE, Krapf D, De la Vega-Beltran, JL, Acevedo JJ, Darszon A (2011) Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian Journal of Andrology*. 13, 395-405.
- Visconti PE, Muschietti JP, Flawia MM, Tezon JG (1990) Bicarbonate dependence of cAMP accumulation induced by phorbol esters in hamster spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1054, 231-236.
- Visconti PE, Ning XP, Fornés MW, Alvarez JG, Stein P, Connors SA, Kopf GS (1999) Cholesterol efflux - mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol

- release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Developmental Biology*. 214, 429-443.
- Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB (2002) Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *Journal of Reproduction Immunology*. 53, 133-150.
- Vladic TV, Afzelius BA, Bronnikov GE (2002) Sperm quality as reflected through morphology in salmon alternative life histories. *Biology of Reproduction*. 66, 98-105.
- Wang MJ, Ou JX, Chen GW, Wu JP, Shi HJ, O WS, Martin-Deleon PA, Chen H (2012) Does prohibitin expression regulate sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and Male fertility? *Antioxidants and Redox Sinaling*. 17, 513-519.
- Ward CR, Storey BT (1984) Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Developmental Biology*. 104, 287-296.
- Westhoff D, Kamp G (1997) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is bound to the fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Journal of Cell Science*. 110, 1821-1829.
- Wickham H (2016) ggplot2: elegant graphics for data analysis. Springer-verlag, Nueva York.
- Williams A, Ford WC (2001) The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. *Journal of Andrology*. 22, 680-695.
- Xia J, Reigada D, Mitchell CH, Ren D (2007) CATSPER channel-mediated Ca²⁺ entry into mouse sperm triggers a tail-to-head propagation. *Biology of Reproduction*. 77, 551-559.
- Yamazaki D, Miyota H, Fanuto Y, Fujihara Y, Ikawa M, Miki H (2016) The Mg²⁺ transporter CNNM4 regulates sperm Ca²⁺ homeostasis and is essential for reproduction. *Journal of Cell Science*. 129, 1940-1949.
- Yanagimachi R (1970) The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *Journal of Reproduction and Fertility*. 23, 193-196.
- Yanagimachi R (1978) Sperm-egg association in mammals. En *Current topics in developmental biology*. Vol. 12, Academic Press. Pag. 83-105.
- Yanagimachi R (1981) Mechanisms of fertilization in mammals. En: Mastroinni L, Biggers J, Editores. *Fertilization and embryonic development in vitro*. Nueva York: Plenum Publishing, 81-182.
- Yanagimachi R (1982) Requirement of extracellular calcium ions for various stages of fertilization and fertilization-related phenomena in the hamster. *Gamete Research*. 5, 323-344.
- Yanagimachi R (1994) Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*. 2, 371-372.
- Yanagimachi R (1994) Mammalian fertilization. En Knobil A, Neill JD, Editores. *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York. Pag. 189-317.
- Yanagimachi R, Usui N (1974) Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Experimental Cell Research*. 89, 161-174.

- Zarintash RJ, Cross NL (1996) Unesterified cholesterol content of human sperm regulates the response of the acrosome to the agonist, progesterone. *Biology of Reproduction*. 55, 19-24.
- Zeng Y, Clark EN, Florman HM (1995) Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Developmental Biology*. 171, 554-563.
- Zeng Y, Oberdorf JA, Florman HM (1996) pH regulation in mouse sperm: identification of Na⁺, Cl⁻, and HCO₃⁻ dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Development Biology*. 173, 510-520.