

# EFECTOS DEL CALCIO, MAGNESIO, ZINC Y RADICALES LIBRES SOBRE LA FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA

DANIEL ZARKA TRIGO

TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID- MUSEO NACIONAL  
DE CIENCIAS NATURALES (CSIC) | 2021 - MADRID

**Universidad Autónoma de Madrid**

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Biología**

**EFFECTOS DEL CALCIO, MAGNESIO, ZINC Y RADICALES LIBRES SOBRE  
LA FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA**

Tesis doctoral presentada por Daniel Zarka Trigo, para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, con mención internacional.

Dirigida por el Dr. Eduardo Roldán Schuth, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Museo Nacional de Ciencias Naturales.

Codirigida por el Dr. Maximiliano Tourmente, Profesor Adjunto de la Universidad Nacional de Córdoba (Argentina), en la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Investigador Adjunto del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas en el Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas.

Tutelado por el Dr. José L. Bella Sombría, Profesor del Dpto. de Biología (Genética) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid.

**El doctorando**

\_\_\_\_\_

**VºBº del Director**

**VºBº del Codirector**

\_\_\_\_\_

**VºBº del Tutor**

\_\_\_\_\_

**Madrid, Enero de 2021**

***“La ciencia no nos ha  
enseñado aun si la locura es, o no, lo  
más sublime de la inteligencia.”***

Edgar Allan Poe.

Tesis presentada por D. Daniel Zarka Trigo, bajo la supervisión de los Dres. Roldán y Tourmente, para optar al Grado de Doctor en el Programa Internacional de Doctorado de Biología, de la Universidad Autónoma de Madrid.

Diciembre de 2020

## **AGRADECIMIENTOS Y COLABORADORES**

**Sin duda alguna, dedicar esta tesis doctoral a mi familia y amigos, por el apoyo incondicional recibido por su parte durante todo el proceso.**

Agradecer al CSIC y a la Universidad de Massachussets, Amherst, en concreto al Grupo de Ecología y Biología de la Reproducción del Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva del Museo Nacional de Ciencias Naturales, y al grupo de investigación del Dr. Visconti en la Facultad de Veterinaria de UMass-Amherst por haberme permitido desarrollar este proyecto con ellos.

Agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación por otorgarme la beca FPI en 2012, así como las becas de Estancias Breves en 2014 y 2016.

Agradecer al Programa de doctorado en Biología de la UAM, muy especialmente a Manuel Pardo, José L. Bella y a M.<sup>a</sup> Carmen López, por su esfuerzo y enorme dedicación para lograr la culminación de este proyecto.

A J. Antonio Rielo y Esperanza Navarro, por las gestiones necesarias relacionadas con el laboratorio y Animalario del departamento, a Nushin y Jerylle, por su colaboración en los bloques 2 y 5 de resultados, a la doctora Gervasi, al doctor Martín-Hidalgo, a Ana María Salicioni y, en especial, al doctor Pablo Visconti por su impecable labor, y su verdadera dedicación en la gestión y desarrollo de toda la tesis doctoral.

A los codirectores de mi tesis doctoral, el Dr. Roldán y el Dr. Tourmente, así como a mi tutor el Dr. Bella.

## DEDICATORIA

Dedico este viaje de ida y vuelta a mi Ítaca personal a mi Penélope y Telémaco personal (mis padres y pareja), a quien les debo agradecer, sin duda alguna, por su paciencia y espera, por sus cuidados y su enorme tolerancia en esta larga carrera. También a todos aquellos compañeros de viaje, en mi Argos particular, que me han ayudado a enfrentar los favores y reveses de esta aventura que, tras muchas andanzas, arriba a buen puerto.

En este camino del héroe, en el que el estudiante se convierte en doctor y completa su Iniciación, agradecer a *mis* Hermes, Hécate y Atenea, por las “*Metis*, *Sofía* y otras gracias otorgadas” que he necesitado para superar a los Circe, Medea y otros gigantes que obstaculizaron mi camino. Manteniendo la metáfora, agradecer la inestimable y desinteresada ayuda de mis argonautas más apreciados; la Dra. Gervasi, el Dr. Visconti, Ana María Salicioni, a los doctores Del Barco-Trillo y Vicens, por sus consejos y experiencias, al Dr. Lombardía (y a todo el COBCM), por su asesoramiento y amistad, y a todos los ya ex becarios del MNCN, especialmente a los jaqueteros, por sus infinitas compañías de comidas, cafés y debates entre doctorandos.

A mis amigos y compañeros de mi actual trabajo, por haber sabido esperar y comprender una situación que ellos no han vivido.

Y a mis abuelos, cuyos relojes de arena se agotaron, a medida que yo vivía esta aventura.

**!!!GRACIAS A TODOS!!!**

## RESUMEN

La funcionalidad espermática consiste en la capacidad de los espermatozoides para formar un cigoto tras su fusión con el gameto femenino. Para ello, los espermatozoides necesitan poder desplazarse (literalmente, nadar) a lo largo del aparato reproductor femenino, cambiar su movimiento en el oviducto (hiperactivación), ser capaces de reconocer al óvulo, experimentar un proceso de exocitosis (reacción acrosómica) para eliminar las cubiertas protectoras del óvulo y, finalmente participar en un proceso de fusión de los dos gametos (fecundación), generando un cigoto viable.

Debido a la complejidad de este tipo celular, la funcionalidad espermática requiere diversos elementos de regulación postranscripcional, basada en eventos de señalización celular dependiente de componentes del entorno, como la presencia de hormonas, pH, calcio o bicarbonato. Además, en el caso de los espermatozoides de los mamíferos, se requiere de un proceso denominado “capacitación”, para que manifiesten su potencial fecundante tras la eyaculación. Según la bibliografía, todos los eventos de la funcionalidad espermática, incluyendo la capacitación, están relacionados con componentes del entorno como el calcio, el bicarbonato, el pH y la progesterona, así como con otros elementos que también se encuentran en el líquido seminal como el magnesio y el zinc.

Los radicales libres alteran la funcionalidad espermática de diversas maneras, favoreciendo el proceso de la capacitación o causando daños irreversibles en los espermatozoides. Se ha sugerido que estos radicales libres son producidos por células adyacentes a los espermatozoides, como son los espermatozoides inmaduros, las células del sistema inmune o por elementos del aparato reproductor femenino, si bien los propios espermatozoides maduros, en condiciones fisiológicas, son capaces de producirlos.

Los objetivos de la presente tesis doctoral son estudiar, de manera integrada, el efecto del calcio, magnesio y el zinc sobre los distintos elementos de la funcionalidad espermática, así como examinar si los espermatozoides de ratón son capaces de producir radicales libres, su efecto sobre la funcionalidad espermática y su relación con la capacitación. Nuestra hipótesis inicial de trabajo

es que el calcio es imprescindible para los aspectos de la funcionalidad espermática estudiados (motilidad, capacitación, hiperactivación y reacción acrosómica), mientras que el magnesio y el zinc, posiblemente, tengan ligeros o nulos efectos sobre la motilidad, complementarios a los del calcio (en el caso del magnesio), siendo el efecto de estos cationes, principalmente como inhibidores de la capacitación, al ser los radicales libres pro-capacitantes, y tanto el magnesio como el zinc parte del sistema antioxidante.

Para explorar esta hipótesis hemos empleado técnicas de evaluación de la cinética espermática asistida por ordenador (CASA), métodos de proteómica (*western-blot*) y de citometría de flujo, además de evaluaciones de la viabilidad y del estatus acrosómico.

Nuestros resultados han demostrado la importancia del calcio sobre la funcionalidad espermática, regulando la oscilación y velocidad de la natación, así como su necesidad en los procesos de capacitación, hiperactivación y reacción acrosómica. También hemos observado el papel del magnesio en la regulación de la linealidad y cadencia del movimiento espermático, el del zinc en la formación de agregados espermáticos, y la capacidad de los espermatozoides de producir  $H_2O_2$  en condiciones basales. Nuestras observaciones han permitido demostrar la relación entre el proceso de la capacitación y la producción de los radicales libres, sin encontrar indicios de que estos últimos sean inductores de la capacitación o la hiperactivación.

## SUMMARY

Sperm functionality consists of the ability of sperm to form a zygote after its fusion with the female gamete. For this, sperm need to be able to move (swim) in the female reproductive tract, change their swimming pattern in the oviduct (hyperactivation), be able to recognize the ovum and experience an exocytotic process (acrosome reaction) in order to remove the protective covers of the ovum, and finally, fuse with the oocyte (fertilization), generating a viable zygote.

Due to the complexity of this cell type, sperm functionality requires a complex post-translational regulation mechanism, based on signalling events dependent on environmental components such as hormones, pH, calcium or bicarbonate. Furthermore, in the case of mammalian spermatozoa, a process called "capacitation" is required for the spermatozoa to fully manifest their fertilising potential after ejaculation. Events of sperm functionality, including capacitation, are thus related to environmental components such as calcium, bicarbonate, pH and progesterone, as well as to other elements also present in the seminal fluid such as magnesium and zinc.

Studies have shown that free radicals alter sperm functionality, being capable of promoting the process of capacitation or causing irreversible damage to sperm. It has been suggested that these free radicals are produced by elements adjacent to sperm, such as immature sperm cells, cells of the immune system or by components of the female reproductive system. However, some authors suggest that mature sperm themselves, under physiological conditions, can produce free radicals.

The objectives of this doctoral thesis are to study, in an integrated manner, the effect of calcium, magnesium and zinc on the different elements of sperm functionality, as well as to determine whether mouse sperm are capable of producing free radicals, their effect on sperm functionality and its relationship with capacitation. Our initial working hypothesis was that calcium is essential for the aspects of sperm functionality studied (motility, capacitation, hyperactivation and acrosome reaction), while magnesium and zinc possibly have little or no effects on motility, and possibly are complementary to those of calcium (in the case of magnesium). Furthermore, we speculate that the effect of magnesium and zinc



could be as inhibitors of the capacitation process, since the free radicals may be capacitating factors, and both cations are part of the antioxidant system.

To examine this hypothesis, we have used computer-assisted sperm analysis techniques (CASA), proteomic methods (western-blot) and flow cytometry, in addition to other methodologies to evaluate viability and acrosomal status. Our results have shown the importance of calcium on sperm functionality, regulating the oscillation and speed of swimming, as well as its need in the processes of capacitation, hyperactivation, and acrosome reaction. We have also observed a role for magnesium in regulating the linearity and cadence of sperm movement, the role of zinc in the formation of sperm aggregates, and the ability of sperm to produce  $H_2O_2$  under basal conditions. Our observations have also shown a relationship between the capacitation process and the production of free radicals, without finding evidence that free radicals are inducers of capacitation or hyperactivation.

## ABREVIATURAS

- AC: Adenilato Ciclasa.
- ACC: Carbonato Cálcico Amorfo, de las siglas en inglés *Amorphous Calcium Carbonate*.
- ALH: Amplitud del movimiento lateral de la cabeza espermática, de las siglas en inglés *Head Lateral Amplitude*. (parámetro de cinética espermática).
- AOs: Antioxidantes.
- CASA: Análisis de espermatozoides asistido por ordenador, de las siglas en inglés *Computer-Assisted Sperm Analysis*.
- BCF: Frecuencia de cruce del batido flagelar, de las siglas en inglés *Beat Cross Frequency* (parámetro de cinética espermática).
- BSA: Albúmina de suero bovino, de las siglas en inglés *Bovine Serum Albumin*.
- CAP: Medio capacitante.
- CAT: Catalasa.
- CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- DO: Daño Oxidativo.
- EGTA: "N,N,N',N'-Ácido tetra-acéticoetilenglicol-bis(2-aminoetileter)", quelante de metales como el calcio y el magnesio.
- EO: Estrés Oxidativo.
- ER: Especies Reactivas.
- GPx: Glutación Peroxidasa.
- GSH / GSSG: Glutación reducido (GSH) y glutación oxidado (GSSG), respectivamente.
- HA: Hiperactivación. Hiperactivado.
- LIN: Linealidad (parámetro de cinética espermática)
- LPO: Peroxidación lipídica, de las siglas en inglés *Lipid PerOxidation*.
- MP: Membrana plasmática.
- NC: Medio no capacitante (de supervivencia).
- OSV: Componentes principales de la velocidad, del inglés *Overall sperm velocity*.
- OTS: Componentes principales de la trayectoria, del inglés *Overall sperm trajectory*.

PKA: Proteína quinasa A.  
PKC: Proteína quinasa C.  
PLA: Fosfolipasa A.  
PLA<sub>2</sub>: Fosfolipasa A<sub>2</sub>.  
PLC: Fosfolipasa C.  
pPKA: Proteínas diana de la PKA, fosforiladas en residuos de serina/treonina.  
pY: Proteínas fosforiladas en residuos de tirosina  
PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados, de las siglas en inglés *Poly-Unsaturated Fatty Acids*.  
RNS: Especies reactivas del nitrógeno, de las siglas en inglés *Reactive Nitrogen Species*.  
RA: Reacción acrosómica.  
ROS: Especies reactivas del oxígeno, del inglés *Reactive Oxygen Species*.  
sACy: Adenilato ciclasa soluble, de las siglas en inglés *soluble Adenylate Cyclase*.  
SOD: Superóxido dismutasa.  
STR: Porcentaje de rectitud, de la palabra inglesa *Straightness* (parámetro de cinética espermática).  
TPEN: "N,N,N',N'-Tetris(2-piridilmetil)etilendiamina"; quelante de zinc.  
TYH: Medio Toyoda, Yokohama y Hosi.  
VAP: Velocidad de trayectoria media, de las siglas en inglés *Average Path Velocity* (parámetro de cinética espermática).  
VCL: Velocidad curvilínea, de las siglas en inglés *Curvilinear Velocity* (parámetro de cinética espermática).  
VSL: Velocidad rectilínea, de las siglas en inglés *Straight-Line Velocity* (parámetro de cinética espermática).  
WOB: Coeficiente de Wobble: Proporción de la oscilación del movimiento espermático (parámetro de cinética espermática).  
ZP: Zona pelúcida.

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS Y COLABORADORES .....	i
DEDICATORIA .....	iii
RESUMEN .....	v
SUMMARY .....	vii
ABREVIATURAS .....	ix
ÍNDICE GENERAL .....	xi
1. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
1.1. El espermatozoide.....	1
1.1.1. Estructura .....	1
1.1.2. Génesis y maduración .....	4
1.1.3. Transporte en el tracto femenino.....	6
1.1.4. Activación de la movilidad y natación .....	7
1.2. Capacitación .....	9
1.2.1. Definición e historia.....	9
1.2.2. Represión y capacitación.....	11
1.2.3. Cambios que ocurren durante la capacitación.....	12
1.2.4. Relación entre capacitación, hiperactivación y reacción acrosómica .....	18
1.3. Hiperactivación.....	21
1.4. Exocitosis del gránulo acrosómico (Reacción acrosómica) .....	23
1.5. Regulación iónica de la función espermática .....	27
1.5.1. El calcio.....	27
1.5.1.1. Papel del calcio en la funcionalidad espermática .....	28
1.5.1.2. El carbonato cálcico amorfo .....	32
1.5.2. El magnesio .....	33
1.5.2.1. Papel del magnesio en la funcionalidad espermática .....	34
1.5.3. El zinc.....	35
1.5.3.1. Papel del zinc en la funcionalidad espermática .....	36
1.6. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y la función espermática.....	41
1.6.1. Las especies reactivas.....	41
1.6.2. Papel de ROS en la función celular.....	43
1.6.3. El sistema antioxidante.....	43
1.6.4. Sistemas antioxidantes en espermatozoides .....	44
1.6.5. Producción de ER en espermatozoides .....	45
1.6.6. Papel de ROS en la capacitación y la reacción acrosómica .....	46
1.6.7. Efectos negativos de ROS en la integridad y función espermática.....	49

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	53
3. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES .....	55
3.1. Animales.....	55
3.2. Obtención e incubación de espermatozoides.....	56
3.2.1. Medios de cultivo .....	56
3.2.2. Sacrificio de animales y extracción de espermatozoides .....	58
3.2.3. Estimación de concentración espermática, dilución de espermatozoides e incubación.....	59
3.3. Incubaciones y muestras.....	60
3.4. Análisis de viabilidad espermática e integridad del acrosoma.....	62
3.4.1. Preparación de las muestras y tinción. ....	62
3.4.2. Valoración de las tinciones .....	62
3.5. Análisis de movilidad y cinética espermática.....	63
3.5.1. Captura de imágenes .....	64
3.5.2. Porcentaje de espermatozoides móviles.....	65
3.5.3. Descriptores de la cinética espermática .....	65
3.5.4. Clasificación de los espermatozoides.....	67
3.6. Análisis de la Capacitación.....	69
3.7. Análisis citométricos .....	71
3.8. Análisis estadístico .....	73
3.8.1. Análisis de Componentes Principales (PCA).....	75
3.9. Efecto de la centrifugación sobre la funcionalidad espermática .....	76
3.10. Variaciones entre laboratorios.....	86
4. EFECTOS DEL CALCIO Y DEL MAGNESIO EN LA FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA .....	91
4.1. Antecedentes.....	91
4.2. Metodología particular .....	92
4.3. Resultados.....	93
4.3.1. Efectos generales sobre la calidad espermática.....	93
4.3.2. Efectos sobre la clasificación de espermatozoides.....	94
4.3.3. Efectos sobre la señalización espermática del proceso de la capacitación ..	99
4.3.4. Efectos sobre la cinética espermática.....	101
4.3.5. Efectos del calcio y el magnesio sobre la velocidad espermática.....	103
4.3.6. Efectos del calcio y el magnesio sobre la trayectoria espermática .....	105
5. COMPARACIÓN ENTRE EL CLORURO DE CALCIO Y EL CARBONATO DE CALCIO AMORFO, Y SU EFECTO EN LA FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA .....	109
5.1. Antecedentes.....	109

5.2. Metodología particular .....	109
5.3. Resultados.....	111
5.3.1. Efectos generales sobre la calidad espermática.....	111
5.3.1. Efectos del ACC sobre el porcentaje de cada clase espermática .....	111
5.3.2. Efectos del ACC sobre la señalización espermática del proceso de la capacitación .....	114
5.3.3. Efectos sobre la cinética espermática.....	117
6. EFECTOS DEL ZINC EN LA FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA .....	123
6.1. Antecedentes.....	123
6.2. Metodología particular .....	124
6.3. Resultados.....	125
6.3.1. Efectos generales sobre la calidad espermática.....	125
6.3.2. Efectos del zinc en la movilidad espermática .....	125
6.3.3. Efectos del zinc sobre la agregación de espermatozoides.....	127
6.3.4. Efectos sobre la clasificación de los espermatozoides .....	130
6.3.5. Efectos sobre la señalización espermática del proceso de la capacitación	131
6.3.6. Efectos sobre la cinética espermática.....	135
6.3.6.1. Efectos del zinc sobre la velocidad espermática .....	136
6.3.6.2. Efectos del zinc sobre la trayectoria espermática .....	137
7. EFECTOS DE LOS RADICALES LIBRES (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) Y LA CATALASA SOBRE LA FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA .....	141
7.1. Antecedentes.....	141
7.2. Metodología particular .....	142
7.3. Resultados.....	145
7.3.1. Efectos generales sobre la calidad espermática.....	145
7.3.1. Efectos sobre la clasificación de espermatozoides.....	147
7.3.1.1. Efectos de ROS sobre cada clase espermática.....	147
7.3.1.1. Efectos de la CAT sobre cada clase espermática .....	148
7.3.2. Efectos sobre la señalización espermática del proceso de la capacitación	150
7.3.3. Efectos sobre la cinética espermática.....	158
7.3.3.1. Efectos de los ROS sobre la velocidad.....	159
7.3.3.2. Efectos de los ROS sobre la trayectoria .....	162
7.3.3.3. Efectos de la CAT sobre la velocidad .....	164
7.3.3.4. Efectos de la CAT sobre la trayectoria.....	164
8. FORMACIÓN DE RADICALES LIBRES POR LOS ESPERMATOZOIDEOS 167	
8.1. Antecedentes.....	167
8.2. Metodología particular .....	167

8.3. Resultados.....	169
8.3.1. Efecto del medio de supervivencia y del medio capacitante sobre la formación de ROS .....	169
8.3.2. Efectos del calcio sobre la formación de ROS, en condiciones capacitantes 172	
8.3.3. Efectos del magnesio sobre la formación de ROS, en condiciones capacitantes.....	174
8.3.4. Efectos del zinc sobre la formación de ROS, en condiciones capacitantes	176
9. DISCUSIÓN.....	179
9.1. El calcio y la funcionalidad espermática .....	179
9.1.1. El calcio y la calidad espermática .....	180
9.1.2. El calcio y la cinética espermática .....	180
9.1.3. El calcio y la capacitación.....	182
9.1.4. El calcio y la hiperactivación .....	182
9.1.5. El calcio y la producción de ROS durante la capacitación .....	183
9.2. El carbonato cálcico amorfo y la funcionalidad espermática .....	183
9.3. El magnesio y la funcionalidad espermática .....	185
9.3.1. El magnesio y la capacitación .....	186
9.3.2. El magnesio y la cinética espermática.....	186
9.4. El zinc y la funcionalidad espermática .....	189
9.4.1. El zinc y la formación de agregados espermáticos .....	189
9.4.2. El zinc y la capacitación.....	190
9.4.3. El zinc, la cinética espermática y la hiperactivación.....	191
9.5. Los ROS y la funcionalidad espermática .....	193
9.5.1. ROS y el proceso de la capacitación .....	193
9.5.2. Los antioxidantes y la funcionalidad espermática.....	195
9.5.3. Efecto de los ROS y de la catalasa sobre la cinética espermática.....	196
9.5.4. Los ROS y el movimiento hiperactivado .....	196
9.6. Producción de ROS por los espermatozoides.....	199
9.6.1. La capacitación y la producción de ROS .....	199
9.6.2. El calcio y la producción de ROS .....	201
9.6.3. El magnesio y la producción de ROS.....	202
9.6.4. El zinc y la producción de ROS .....	203
10. CONCLUSIONES.....	205
11. BIBLIOGRAFIA.....	209
ANEXOS.....	245

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

---

### 1.1.El espermatozoide

Los espermatozoides son las células germinales masculinas de la mayoría de las especies animales y de algunas especies vegetales (por ejemplo, algas). Son células haploides muy especializadas y compartimentadas, cuya función es la fecundación del óvulo (Chang y Pincus, 1951; de Lamirande *et al.*, 1997; O'Flaherty, 2015). El estudio de este tipo celular es de gran interés por su papel en la fecundación y en la reproducción. Debido a diversos factores, tanto ambientales (polución, radiación, calidad nutritiva), como conductuales (tabaquismo, alcoholismo, dieta) o enfermedades, se está produciendo una merma en la calidad espermática de gran variedad de especies, desde animales en peligro de extinción, animales de interés cinegético o ganadero, hasta humanos. Por ello, en la actualidad ha aumentado el interés por las investigaciones sobre la funcionalidad y mejora de la calidad espermática.

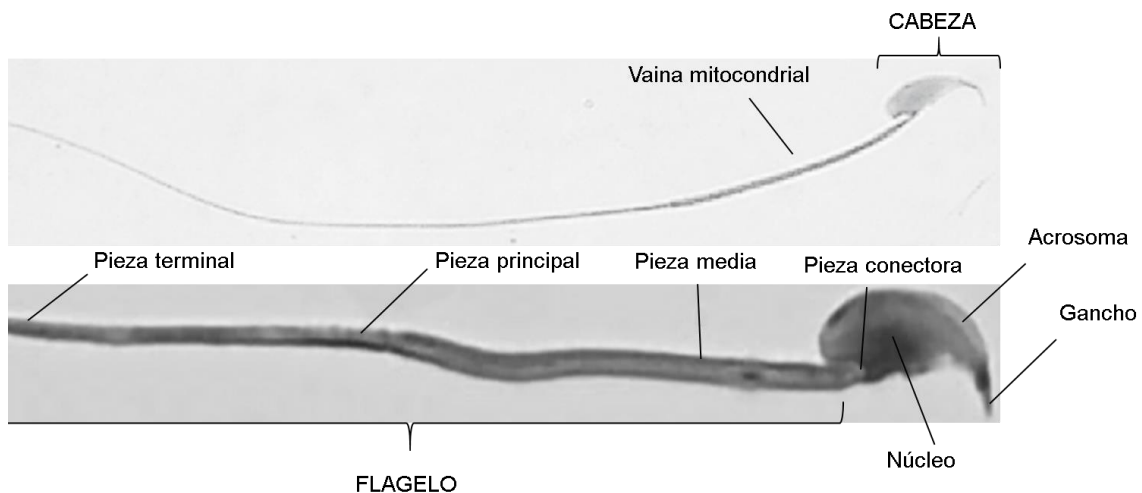
Entre los factores que se tienen en cuenta para definir la calidad espermática, se encuentran la viabilidad, movilidad y morfología (Mohammadzadeh *et al.*, 2019). En los mamíferos, además, se requieren los marcadores propios del proceso de capacitación, hiperactivación y reacción acrosómica (Morte *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2017). Otro de los marcadores principales de la calidad espermática es la integridad de la cromatina, que está relacionada con el éxito reproductivo y la salud del embrión (Gosálvez *et al.*, 2008; Tvrdá *et al.*, 2018; Esteves *et al.*, 2020).

#### 1.1.1. Estructura

Los espermatozoides son células altamente especializadas, de corta vida media, carentes de la mayoría de los orgánulos de las células somáticas. Debido a la particular compactación de la cromatina nuclear con protaminas, los espermatozoides carecen de un núcleo transduccionalmente activo, por lo que su programación celular está basada en eventos postraduccionales, y en la alteración de la organización de los dominios de la membrana plasmática (MP) (Guraya, 2000; Arcelay *et al.*, 2008).



La morfología de los espermatozoides está adaptada a la natación, por ello tiene poco contenido citoplasmático y su citoesqueleto está muy especializado (Breed, 2005; Harcourt, 2006). Los espermatozoides completamente maduros tienen forma alargada, con asimetría anteroposterior y con múltiples membranas, que forman dos regiones morfológica y funcionalmente diferenciados: la cabeza, y el flagelo (Tourmente *et al.*, 2009) (**Fig. 1.1**).



**Figura 1.1** Morfología de los espermatozoides de ratón, y regiones de la CABEZA (acrosoma, núcleo y gancho) y del FLAGELO (piezas media, principal y terminal)

La **cabeza espermática** es la región anterior de célula. En ella se encuentra el núcleo celular, que es haploide, y que carece de actividad transcritora. Su cromatina está fuertemente compactada por acción de las proteínas espermáticas de unión al ADN (protaminas), que sustituyen a las histonas en la protección del núcleo durante la espermatogénesis (Fujii y Tsunoda, 2011; Lüke *et al.*, 2014; Lüke, Tourmente y Roldan, 2016; Lüke, Tourmente, Dopazo, *et al.*, 2016), al carecer los espermatozoides de sistemas de reparación de ADN (Gosálvez *et al.*, 2008; Esteves *et al.*, 2020).

En la parte anterior de la cabeza de los espermatozoides de los mamíferos, entre el núcleo y la membrana plasmática apical, se encuentra una vesícula de secreción propia de este tipo celular, denominada acrosoma. El acrosoma es un gránulo excitotóxico que contiene metaloproteasas y otros elementos que, al ser liberados, permiten al gameto masculino atravesar al *cumulus oophorus*, así como la *zona pelúcida* (ZP) y, por lo tanto, fecundar al óvulo.

Los espermatozoides de la mayoría de las especies de roedores murinos, tienen morfología falciforme, presentando simetría bilateral en la cabeza, debido al aplanamiento lateral del núcleo (Tourmente *et al.*, 2016). En algunas especies de roedores, se desarrollan además de uno hasta cinco apéndices situados sobre la región acrosómica, denominados “ganchos” (Breed, 2005; Shi *et al.*, 2016; Alipour *et al.*, 2018). Inicialmente se consideró que la función de los ganchos era la formación de los *trenes espermáticos*, un tipo de agrupación espermática colaborativa (Immler *et al.*, 2007; Breed *et al.*, 2014), sin embargo, evidencias recientes indican que el gancho es una adaptación evolutiva a la natación, permitiendo que los espermatozoides adquieran una forma más hidrodinámica, sin estar relacionado a la formación de *trenes* de espermatozoides (Tourmente *et al.*, 2016; Varea-Sánchez *et al.*, 2016).

El **flagelo** es el aparato motor de los espermatozoides. Se divide en tres subsecciones, denominadas *pieza intermedia*, *principal* y *terminal*. Cada una de estas regiones presenta características bien definidas en términos de organización del citoesqueleto, función y señalización. El elemento común a las tres regiones es un axonema típico de células eucariotas, formado por un doblete central de microtúbulos, rodeado por nueve dobletes incompletos (Fawcett y Phillips, 1969; Gervasi *et al.*, 2018). La “*pieza intermedia*”, conecta la cabeza espermática y el flagelo. Esta región posee un complejo estructural firme para que ambas partes celulares queden unidas (pieza conectora) (Turner, 2006). Bajo la membrana celular de la pieza intermedia se encuentra un denso complejo mitocondrial con estructura de doble hélice, denominado “vaina mitocondrial” (Gervasi *et al.*, 2018). La “*pieza principal*” ocupa dos tercios de la longitud total del flagelo y se compone de dos estructuras concéntricas que rodean al axonema central, formado por fibras densas externas y por la vaina fibrosa, la cual está formada por un conjunto de proteínas con papel estructural y funcional, que sirven de anclaje entre el citoesqueleto y algunos elementos que intervienen en la señalización celular (Eddy *et al.*, 2003; Eddy, 2007). La “*pieza terminal*” se forma únicamente por el axonema y la MP que lo recubre (Turner, 2006).

Es necesario mencionar que la MP de los espermatozoides les convierten en células altamente polarizadas, debido a la existencia de dominios de membrana muy definidos (Sidhu y Guraya, 1989; Oura y Toshimori, 1990; Au *et al.*, 2015).

La composición y organización de la MP se configura durante la espermatogénesis y se altera durante los eventos de represión, maduración post-testicular, capacitación, y hasta el momento de la fusión con el óvulo (Myles y Primakoff, 1997; Guraya, 2000). En los espermatozoides de los mamíferos, la composición de la MP antes de la eyaculación es muy heterogénea, debido a la presencia de dominios de esteroides, denominados “complejos de esterol-caveolina”. Estos complejos sirven como andamios para acoplar una serie de proteínas que inducirán diferentes vías de señalización (Olivera *et al.*, 2006). En la cabeza hay dos subdominios, la subacrosomal, rica en fosfolípidos, y la acrosomal, caracterizada por presentar islas de composición ordenada de colesterol y esfingolípidos anclados a caveolinas (Olivera *et al.*, 2006; Au *et al.*, 2015). Estas islas están inmersas en una membrana de composición “desordenada” y permiten la compartimentación de las vías de señalización en diversas regiones de la célula (Au *et al.*, 2015).

### **1.1.2. Génesis y maduración**

Los espermatozoides se forman en los túbulos seminíferos de los testículos, mediante un proceso denominado “espermatogénesis”, y posteriormente maduran en el epidídimo (Abou-haila y Tulsiani, 2009). La espermatogénesis incluye eventos de proliferación celular por mitosis de las células germinales masculinas (espermatogonias), y su posterior diferenciación en espermatoцитos. Este proceso está muy conservado entre los organismos, y se divide en tres fases: fase de proliferación mitótica, fase meiótica y fase post-meiótica, también conocida como espermiogénesis (Kanippayoor *et al.*, 2013; Rathke *et al.*, 2014). En la fase mitótica, las células germinales masculinas (espermatogonias), se dividen para proliferar. Algunas de estas espermatogonias hijas se diferencian en espermatoцитos, que inician la fase meiótica, para dar lugar a las espermátidas redondas. En la fase post-meiótica, las espermátidas redondas se vuelven alargadas y ocurren los eventos de extrusión del citoplasma, en la que los orgánulos celulares no necesarios para los espermatozoides son eliminados fuera de la célula (Kanippayoor *et al.*, 2013; Rathke *et al.*, 2014; Nishimura y L’Hernault, 2017). El final del proceso de la espermatogénesis se denomina espermiogénesis, y es la transformación de las espermátidas alargadas en espermatozoides mediante una serie de cambios estructurales y funcionales

como el alargamiento y aplastamiento del núcleo y la condensación de la cromatina (Erenpreiss *et al.*, 2006). Durante este proceso, además, los espermatozoides desarrollan la capacidad de nadar (de Lamirande *et al.*, 1997) y van acumulando el calcio y bicarbonato en sus reservorios espermáticos (Salicioni *et al.*, 2007). Al final de la espermatogénesis, los espermatozoides de los mamíferos quedan en un estado quiescente, gracias a las secreciones de las células epiteliales, de las glándulas anexas y del líquido luminal (Guraya, 2000).

Se ha demostrado que los espermatozoides de los testículos, así como del segmento inicial y de la cabeza del epidídimo, no pueden desarrollar la capacidad de fecundar al óvulo, ni activar su movimiento "*in vitro*" (salvo que el medio de cultivo contenga detergente), mientras que los espermatozoides del cuerpo y la cola del epidídimo sí tienen esa capacidad (Gervasi y Visconti, 2017; Conine *et al.*, 2018). También se ha demostrado que los espermatozoides desarrollan la capacidad de reconocer y unirse a la ZP en su tránsito entre las regiones del corpus y del cauda (Druart y de Graaf, 2018).

Existe un debate sobre el grado de maduración de los espermatozoides al final de su tránsito en el epidídimo. Algunos autores sostienen que, tras la maduración post-testicular, los espermatozoides se encuentran completamente maduros, pero son sometidos a un proceso de represión (inhibición funcional), para, posteriormente, ser almacenados en estado "quiescente" hasta el momento de la eyaculación. Una vez en contacto con el tracto reproductor femenino, los espermatozoides quedarían expuestos a elementos que inducirían su des-represión, lo que se traduce en la activación de su movimiento y la manifestación de su capacidad para fecundar al óvulo (Bedford, 1979). Otros autores sugieren que los espermatozoides de los mamíferos no son completamente maduros tras la maduración post-testicular en el epidídimo, y que requieren componentes del tracto reproductor femenino para completar su maduración. Según estos autores, en la región caudal del epidídimo, los espermatozoides no serían funcionalmente maduros y quedarían almacenados en estado quiescente en espera de esas señales extracelulares que le permitirían continuar su maduración (Gervasi y Visconti, 2017; Druart y de Graaf, 2018; Samanta *et al.*, 2018). La sucesión de eventos que implican la des-represión o maduración espermática tras eyaculación se han denominado "capacitación", pues permiten

a los espermatozoides desarrollar la capacidad de fecundar al óvulo, de la cual carecen inmediatamente tras la eyaculación.

Son necesarios más estudios que permitan una comprensión clara de los mecanismos moleculares que ocurren durante el tránsito de los espermatozoides a lo largo del epidídimo, y de la capacidad de éstos de fecundar al óvulo en las distintas fases de dicho tránsito.

### **1.1.3. Transporte en el tracto femenino**

Durante la eyaculación, los espermatozoides se mezclan con el plasma seminal, antes de entrar en contacto con el aparato reproductor femenino. El líquido seminal es el conjunto de secreciones de varios órganos del tracto genital masculino, como el epidídimo, la próstata, las vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales (Druart y de Graaf, 2018). Este plasma está compuesto por diversos elementos, entre los que se encuentran represores de la función espermática, elementos protectores de los espermatozoides, componentes inductores de la capacitación, proteínas involucradas en la respuesta inmune del tracto femenino, azúcares y lípidos (García-Tello *et al.*, 2014; Alvarez-Fernandez *et al.*, 2019). Su composición varía en función de la especie animal y las condiciones fisiológicas del sujeto de estudio (dieta, exposición a contaminantes, estrés, etc.) (revisado en Samanta *et al.*, 2018). Diversos investigadores, relacionan a los componentes del líquido seminal y su calidad, con la función espermática en diversas especies de mamíferos (Valsa *et al.*, 2012; Pahune *et al.*, 2013; Hadj Ali *et al.*, 2018; Narasimhaiah *et al.*, 2018). Se ha demostrado que, en la mayoría de las especies estudiadas, la breve interacción entre los espermatozoides y el plasma seminal facilita la des-represión/maduración post-testicular de los mismos, además de favorecer su protección y transporte a lo largo del tracto reproductor femenino. Entre los componentes del líquido seminal que modulan la funcionalidad espermática se encuentran el calcio, bicarbonato, magnesio, zinc y el sistema antioxidante (Gervasi y Visconti, 2017; Druart y de Graaf, 2018; Samanta *et al.*, 2018).

Con la eyaculación en el tracto reproductor femenino, los espermatozoides quedan expuestos a un entorno distinto, siendo liberados de las sustancias

inhibitorias que les mantenía en un estado latente (Alvarez-Fernandez *et al.*, 2019; Hernández-Silva y Chirinos, 2019; Lobo y Parte, 2019). Esto induce a la depleción del colesterol y la reorganización de su MP, la movilización de los corpúsculos de Hermes y la aparición de canales iónicos y otros componentes de la señalización celular, que permiten el inicio del nado, su des-represión/maduración y el inicio de la funcionalidad espermática (Parks, J. E., and Ehrenwald, 1990; Visconti, Bailey, *et al.*, 1995). Entre las consecuencias de este evento se encuentra el inicio del movimiento del flagelo para nadar a lo largo del tracto reproductor femenino, es decir, el proceso denominado “activación espermática” (Gervasi y Visconti, 2017; Samanta *et al.*, 2018).

#### 1.1.4. Activación de la movilidad y natación

Con la reorganización de la MP y su permeabilización, se activa un influjo de iones, que, permite el inicio de la movilidad espermática, y desencadena los eventos de señalización celular postransduccional, necesarios para la funcionalidad espermática (Guraya, 1987, 2000; Olivera *et al.*, 2006).

El nado de los espermatozoides que se desarrolla tras la eyaculación, se denomina **movimiento activado** (Visconti, Bailey, *et al.*, 1995; de Lamirande y O’Flaherty, 2008), y se caracteriza por un batido flagelar simétrico y de baja amplitud (Suarez, Drost, Redfern, and Gottlieb, 1990; de Lamirande y O’Flaherty, 2008). Esta natación facilita el desplazamiento progresivo y lineal del espermatozoide, desde el lugar de la eyaculación, hasta el oviducto, apoyándose en el movimiento peristáltico ocasionado por las contracciones de distintas porciones del tracto reproductor femenino (Suarez y Pacey, 2006; Suarez y Wu, 2016). Entre los requisitos del inicio de esta activación se encuentran el incremento intracelular de bicarbonato, de pH y la presencia de progesterona en el entorno. El aumento de bicarbonato dentro de los espermatozoides se logra con la activación de sus cotransportadores, ( $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  (NBC) y  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ ), mientras que el del pH se debe al intercambiador espermático de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (sNHE) y al canal de protones Hv1.

Una vez en el oviducto, los espermatozoides se adhieren a las células del istmo, quedando nuevamente en estado quiescente. Durante esta adherencia, tienen lugar eventos de señalización celular que, en los espermatozoides previamente capacitados, permiten el desarrollo del patrón de movimiento denominado hiperactivación (HA) (Yanagimachi, 1970; Hunter y Rodríguez-Martínez, 2004; Gómez Montoto *et al.*, 2011). La HA es el patrón de natación típico de los espermatozoides capacitados y les permite liberarse de las células del istmo, así como atravesar el entorno viscoso del oviducto y encontrar al óvulo (Demott y Suarez, 1992; Ho y Suarez, 2001a; Suarez, 2008). Algunos autores sostienen que tanto el movimiento activo, como el HA, responden a un proceso de quimiotaxis que guía a los espermatozoides hacia el óvulo mediante señales de calcio (Márquez *et al.*, 2007; Publicover *et al.*, 2008; Chang y Suarez, 2010; Sánchez-Cárdenas *et al.*, 2018; Achikanu *et al.*, 2019; Beigi Harchegani *et al.*, 2019), de hormonas (Giojalas, 1998; Teves *et al.*, 2009; Lishko *et al.*, 2011) u otros elementos del aparato reproductor femenino (Suarez y Pacey, 2006; Suarez y Wu, 2016). Estas señales activarían distintas proteínas de la vaina fibrosa (cascadas dependientes de AMPc, calcio, dos miembros de las proteínas de unión a quinasas A (*Anchoring Kinase-A proteins: AKAPs*): AKAP3, AKAP4 y los canales de calcio propios de los espermatozoides (*CatSper*, CRISP1) (Eddy *et al.*, 2003; Ernesto *et al.*, 2015; Alvarez-Fernandez *et al.*, 2019).

El movimiento de los espermatozoides se debe a su flagelo, el cual propulsa a la célula en base al tipo de batido flagelar que realice (Suarez y Pacey, 2006; Turner, 2006; Sousa *et al.*, 2011). El calcio y el bicarbonato están considerados como los reguladores principales de la movilidad de los espermatozoides: A bajas concentraciones de calcio intracelular (en torno a 10–40 nM en espermatozoides humanos), los flagelos baten simétricamente, pero cuando los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  aumentan (a 100–300 nM en espermatozoides humanos), el batido flagelar aumenta y ocurre de forma menos simétrica (movimiento HA) (Pereira *et al.*, 2017). El papel del calcio sobre la movilidad espermática se debe a la relación entre componentes del citoesqueleto como la dineína, con elementos de la señalización celular dependientes de calcio, como la calmodulina, que regula a las quinasas, fosfatasa y sACy, enzimas que intervienen en la regulación del movimiento flagelar (Pereira *et al.*, 2017).

Otra de las proteínas implicadas en la regulación de la movilidad espermática es la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), que es uno de los principales reguladores del potencial de membrana mitocondrial, y que interviene en la regulación del movimiento y de la RA en espermatozoides de cerdo (Hurtado de Llera *et al.*, 2016), humanos (Xu *et al.*, 2007), ratones (Tartarin *et al.*, 2012), caballos (Córdova *et al.*, 2014) y gallos (Nguyen *et al.*, 2014). Estas investigaciones sugieren que la inhibición de AMPK disminuye el porcentaje de espermatozoides móviles, su velocidad curvilínea, la velocidad promedio de la trayectoria, y el porcentaje de espermatozoides vigorosos (Hurtado de Llera *et al.*, 2016). AMPK también regula la movilidad espermática fosforilando sustratos proteicos implicados en el aparato central del axonema, así como a otras estructuras relacionadas que son esenciales para la movilidad flagelar, adecuando la movilidad espermática a la presencia o ausencia de bicarbonato, calcio y albúmina en el entorno (Hurtado de Llera *et al.*, 2016).

## **1.2. Capacitación**

### **1.2.1. Definición e historia**

La capacitación es un conjunto de eventos que implican cambios morfológicos, fisiológicos y funcionales, que ocurren desde el momento de la eyaculación, cuando los espermatozoides de los mamíferos entran en contacto con el aparato reproductor femenino (Abou-haila y Tulsiani, 2009). Esta sucesión de eventos permite que los espermatozoides manifiesten su potencial de fecundación (Chang, 1984; Visconti, Bailey, *et al.*, 1995; Leemans *et al.*, 2019). Algunos autores sugieren que los cambios fisiológicos que ocurren en los espermatozoides durante este proceso no son un evento único, sino una serie de procesos secuenciales y concomitantes, relacionados con otros procesos como la hiperactivación y la reacción acrosómica (Visconti, 2009).

El inicio de la capacitación ocurre con la reorganización e hiperpolarización de la MP, y por las alteraciones del citoesqueleto asociadas a ésta (de Lamirande *et al.*, 1997; Cross, 1998; Guraya, 2000). Estos eventos conducen a la activación de la señalización celular mediante la activación de la PKA y la fosforilación de proteínas en residuos de serina/treonina o en residuos de tirosina (Visconti y



Kopf, 1998; De La Vega-Beltran *et al.*, 2012; Hurtado de Llera *et al.*, 2016). Según algunos autores, los cambios que ocurren durante la capacitación también son necesarios para el desarrollo de la HA y la exocitosis del acrosoma (“*reacción acrosómica*” - RA) en el momento adecuado (de Lamirande *et al.*, 1997; Suarez, 2008; Hurtado de Llera *et al.*, 2016), así como para el reconocimiento y fusión con el óvulo (Jin y Yang, 2017).

La capacitación fue descubierta y descrita por dos autores, de manera independiente, Austin y Chang, en ratas y conejos respectivamente, a mediados del siglo XX (Austin, 1951, 1952; Chang, 1951; Chang y Pincus, 1951). Este proceso ha sido inicialmente descrito desde un punto de vista operativo, de manera que se han incluido todos los eventos que tienen lugar en los espermatozoides, desde la eyaculación hasta la fecundación del óvulo (Austin, 1952). Desde entonces, la capacitación está siendo estudiada desde distintas perspectivas, para comprender y mejorar la funcionalidad espermática, así como para caracterizar la secuencia de eventos que tienen lugar, incluyendo su inducción, los cambios que genera en los espermatozoides y cómo varían los múltiples eventos en las distintas especies (Bosakova *et al.*, 2018; Leemans *et al.*, 2019; Soriano-Úbeda *et al.*, 2019). Entre las primeras publicaciones sobre la capacitación, se encuentran investigaciones realizadas tanto *in vivo* como *in vitro*, en diversas especies como ratón (Toyoda, Yokoyama, *et al.*, 1971; Toyoda, Yokoyama, *et al.*, 1971; Neill y Olds-Clarke, 1987; Demott y Suarez, 1992), hámster (Ohzu y Yanagimachi, 1982), conejos (Young y Bodt, 1994), toros (Parrish *et al.*, 1988), simios (Wolf *et al.*, 1989; Vandervoort *et al.*, 1994) y humanos (Mbizvo *et al.*, 1990). Estas investigaciones han permitido definir a la capacitación como el conjunto de eventos que ocurren desde que los espermatozoides de los mamíferos entran en contacto con el tracto reproductor femenino, hasta que manifiestan su potencial de fecundación (Guraya, 2000).

### 1.2.2. Represión y capacitación

Durante su formación y maduración en el aparato reproductor masculino, los espermatozoides van adquiriendo la capacidad de moverse (Guraya, 2000). Cuando los espermatozoides se localizan en el epidídimo, y posteriormente cuando están en contacto con el líquido seminal, quedan expuestos a factores anti-capacitantes y estabilizadores del acrosoma, permitiéndoles adquirir y mantener su estado de latencia (Guraya, 2000). En estos momentos, se adhieren a sus MP diversos elementos como colesterol, zinc, espermina, y otras moléculas que forman un envoltorio estabilizador y con efecto anti-capacitante (Guraya y Sidhu, 1991; Knobil *et al.*, 1994). Este recubrimiento aumenta la carga negativa de la MP, e inhibe la funcionalidad espermática, evitando activaciones prematuras y espontáneas, que disminuirían su éxito reproductor. El colesterol y la enzima colesteril-sulfato son los principales estabilizadores de la MP, limitando la permeabilidad de los iones así como la inserción de proteínas y su movilidad en los “*lipid-rafts*” (Parks y Ehrenwald, 1990; de Lamirande *et al.*, 1997; Leclerc *et al.*, 1997). Además, parte del efecto anti-capacitante de esta capa se debe a que, algunos de sus componentes actúan de análogos no agonistas que bloquean diversos receptores del espermatozoide, impidiendo el desarrollo de la RA, así como el influjo de calcio y el intercambio de calcio/sodio necesario para la capacitación (Guraya, 2000).

Tanto la activación de la movilidad, como la salida de la fase de latencia, ocurren tras la eyaculación, cuando comienza la interacción del espermatozoide con los componentes del tracto reproductor femenino (Olivera *et al.*, 2006). Para que se inicie la capacidad de fecundar del espermatozoide, se debe dar la eliminación del envoltorio anti-capacitante, lo que ocurre cuando los espermatozoides entran en contacto *mucus cervical* en su nado hacia el cérvix uterino. Este *mucus* causa la pérdida de colesterol, lectinas, proteínas seminales y epididimarias en la superficie espermática (Guraya y Sidhu, 1991; Olivera *et al.*, 2006). Se ha sugerido que una molécula tipo albúmina (Guraya, 2000), muy abundante en el tracto reproductor femenino, junto con la progesterona (Abou-haila y Tulsiani, 2009) actúan de captadores de esteroides, causando la fluidificación y permeabilización de la MP (Knobil *et al.*, 1994), en espermatozoides de ratas, ratones, conejos y humanos (Dunbar y O’Rand, 1991).

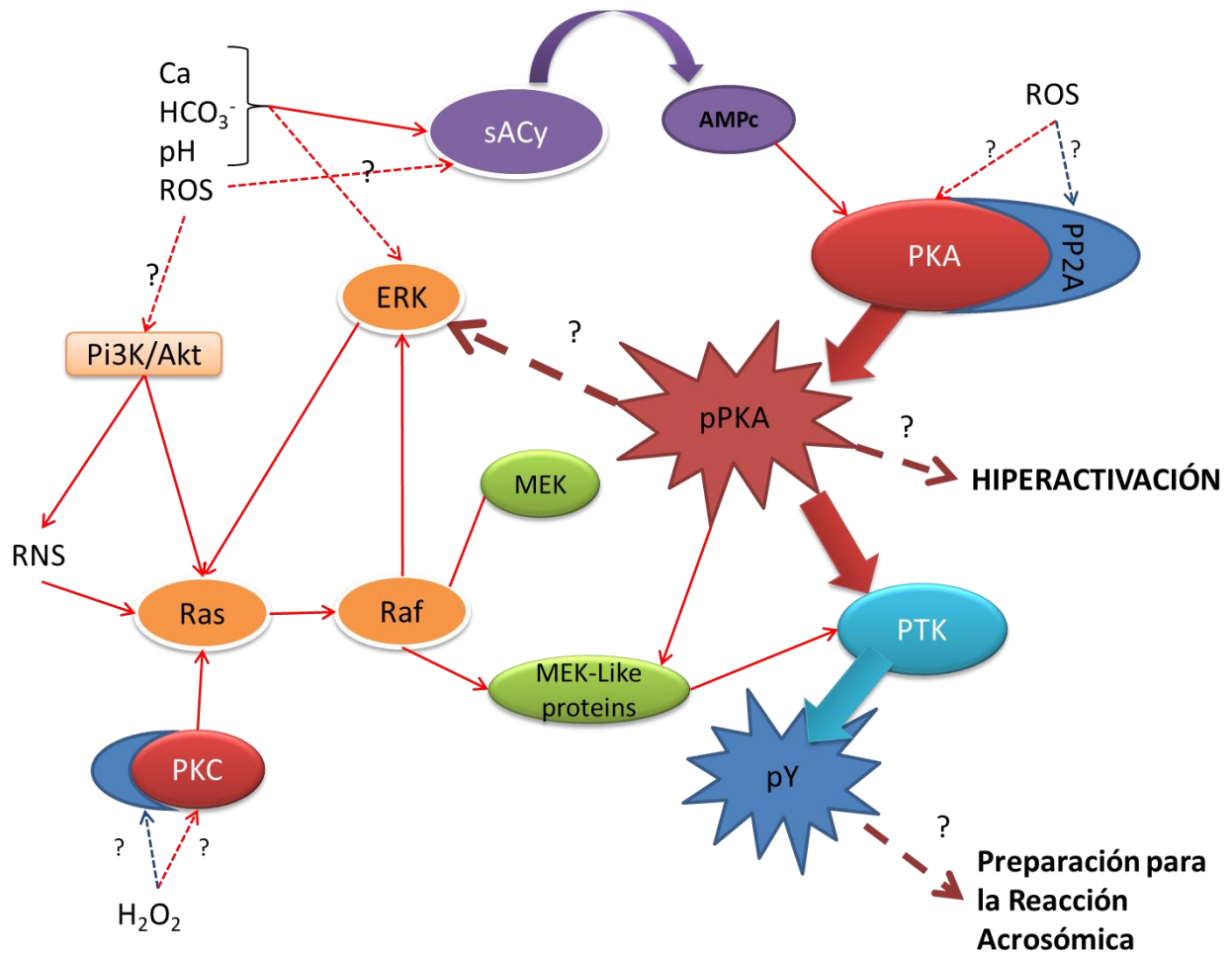
Tras la eliminación de los componentes estabilizadores, la reorganización de la MP y del citoesqueleto, permite que se inicien los eventos de señalización celular de la capacitación (de Lamirande *et al.*, 1997).



### 1.2.3. Cambios que ocurren durante la capacitación

Las modificaciones que ocurren durante la capacitación están reguladas, y son dependientes, de señales extracelulares, para preservar el éxito reproductor de los espermatozoides, ya que una capacitación precoz conlleva la pérdida de la capacidad fecundante, y una capacitación muy lenta impide fecundar el óvulo a tiempo (de Lamirande *et al.*, 1997; Leclerc *et al.*, 1997; Breitbart y Naor, 1999).

Los cambios de la capacitación se dan tanto en la zona del flagelo, como en la cabeza del espermatozoide, a nivel de la membrana, del citosol y del citoesqueleto. Estos últimos se deben a la interacción entre diversas quinasas que, al principio del proceso, inducen la formación de F-actina (polimerización de actina dependiente de la capacitación) lo que implica la reorganización del citoesqueleto. También interviene la posterior despolimerización de la actina (formación de G-actina) para el desarrollo de la RA (Cohen *et al.*, 2004; Breitbart *et al.*, 2006). Entre los cambios moleculares que tienen lugar se incluyen el incremento del pH y del calcio intracelular (Gervasi y Visconti, 2017), así como el incremento y ulterior disminución de la fluidez de MP y su reorganización (Au *et al.*, 2015), lo que permite la activación de cascadas de señalización celular (Stival *et al.*, 2016; Gervasi y Visconti, 2017). Estos cambios fisiológicos afectan a su movilidad, aumentan el metabolismo, el uso de sustratos y la respuesta a señales celulares (Olds-Clarke, 1990; Dunbar and O'Rand, 1991; Knobil *et al.*, 1994; Guraya, 2000; Huang *et al.*, 2017; Arroyo-Salvo *et al.*, 2019).

En la **figura 1.2** se ilustran las principales vías de señalización de la capacitación.



-  Activación de proteína demostrada
-  Activación de proteínas alternativa, propuesta en la bibliografía

**Proteínas:**

sACy: Adenilato ciclasa soluble.  
 PKA: Proteína quinasa A. PP2A: Fosfatasa A.  
 PKC: Proteínas quinasa C.  
 Ras/Raf/ERK/MEK: Proteínas asociadas a la familia de las MAPquinasas.  
 PTK: Proteína tirosin-quinasa.

**Cascadas de señalización celular:**

pPKA: Proteínas fosforiladas en dianas de la proteína PKA.  
 pY: Proteínas fosforiladas en residuos de tirosina.

**Figura 1.2:** Señalización celular de la capacitación: Vías de señalización celular (consenso) de la capacitación de espermatozoides en mamíferos. Los diferentes cambios a los que se somete la célula desde la eyaculación detonan el proceso de la capacitación. La entrada de calcio, bicarbonato y el incremento de pH, activan a la enzima AC, que activa a la PKA mediante AMPc. Ello desarrolla una cascada de fosforilaciones que activan otros complejos enzimáticos, y posteriormente, una segunda cascada de fosforilaciones (en residuos de tirosina). En la imagen se ilustra como otros posibles inductores de la capacitación (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> principalmente) pueden inducir la activación de PKA por medio de la ruta de Ras/Raf, Pi3K/Akt y PP2A/PKA.

El bicarbonato interviene en la hiperpolarización de la MP (Demarco *et al.*, 2003), en el incremento del pH intraespermático necesario para la capacitación (Abouhaila y Tulsiani, 2009), y participa en la activación de la adenilato ciclasa (AC) (Harrison *et al.*, 2005; Visconti *et al.*, 2011). El incremento de pH se da principalmente en la cabeza y en la pieza media de los espermatozoides, durante el paso de éstos por el oviducto (Leclerc *et al.*, 1996; Visconti *et al.*, 2011). Estos cambios, junto con las variaciones de temperatura y la presencia de hormonas a lo largo del tracto reproductor femenino, desencadenan los primeros eventos de la señalización celular asociada a la capacitación (Pereira *et al.*, 2017): En algunas especies, como ratones y humanos, el incremento intracelular de bicarbonato y pH ocurridos durante la activación de la movilidad, así como la presencia de progesterona en el aparato reproductor femenino, conducen al incremento intracelular de calcio (debido a la activación de *CatSper*), el cual también ocurre tanto por la presencia de albúmina en el eyaculado, como de glicoproteínas en el aparato reproductor femenino.

El aumento del calcio intraespermático favorece el incremento de la actividad glucolítica, y de la actividad del axonema, iniciando los procesos de capacitación y de la activación del movimiento progresivo. El calcio también interviene en la hiperpolarización de la MP, pero su principal función es la activación de la AC junto con el bicarbonato, la cual produce AMPc. Además, el incremento intracelular de calcio y bicarbonato se relaciona con la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), que interviene en procesos de quimiotaxis y RA (Roldan y Vazquez, 1996; Breitbart y Spungin, 1997; Roldan y Fragio, 2015).

De todas las AC presentes en los espermatozoides de los mamíferos, su conformación soluble (sACy) es la más activa, pero no la única, existiendo también la AC-transmembrana, implicada en el desarrollo de la HA (Allouche-Fitoussi *et al.*, 2019). El incremento de AMPc está asociado a cambios de movilidad y a variaciones en el patrón de proteínas fosforiladas de los espermatozoides de humanos (Nassar, 1999), y de otros mamíferos como simios y rata (Sakkas *et al.*, 2003; Urner y Sakkas, 2003). El incremento de AMPc activa a la proteína quinasa A (PKA), que induce la fosforilación de proteínas del flagelo, entre las que se encuentra la dineína axonémica, potenciando el consumo de

ATP y provocando un nuevo incremento del pH en el interior de los espermatozoides (revisado en Pereira *et al.*, 2017). La PKA también está implicada en la formación de F-actina necesaria para la movilidad y para la reorganización del citoesqueleto durante la capacitación.

Algunas publicaciones sugieren que el incremento de AMPc vía AC es uno de los eventos más importantes de la capacitación, y que es necesario para la activación de la movilidad de los espermatozoides (revisado en Brukman *et al.*, 2018). Los espermatozoides de los mamíferos tienen AC transmembrana (ACt), y solubles (sACy, también conocidas como AC10. Estas enzimas se activan por calcio y calcio/bicarbonato, respectivamente, y producen al segundo mensajero adenosín monofosfato-3',5' cíclico (AMPc) (Visconti, Bailey, *et al.*, 1995; Visconti, Moore, *et al.*, 1995). Se ha sugerido que la AC también puede ser estimulada por algunos ROS, como el superóxido y el peróxido de hidrógeno (de Lamirande y O'Flaherty, 2008). Tras la activación de AC, el AMPc producido activa a la PKA, la cual fosforila a sus proteínas diana (denominadas pPKA), ocasionando una cascada de señalización (Pereira *et al.*, 2017), fundamental para la capacitación *in vitro* (Naresh y Atreja, 2015).

La PKA es una proteína tetramérica con función serin-treonin-quinasa, ubicua en diversos tejidos, que interviene en multitud de eventos celulares, al ser promotora de cascadas de señalización, como las cascadas de las MAP quinasas (PI3K2) (Visconti, Moore, *et al.*, 1995; Breitbart *et al.*, 2010; Jin y Yang, 2017). PKA está inhibida por las fosfatasas, y su activación es dependiente del AMPc.

Tanto PKA como la proteína quinasa C (PKC), intervienen en la reorganización del citoesqueleto espermático durante la capacitación, involucrando a las enzimas fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) y la fosfoinositol 4 quinasa (PI4K), y por lo tanto, a la fosfolipasa D (PLD) (Cohen *et al.*, 2004; Etkovitz *et al.*, 2007; Breitbart y Etkovitz, 2011). En los espermatozoides de los mamíferos incubados *in vitro*, PKA activa la cascada de fosforilación en residuos de tirosina (pY) de diversas proteínas durante la capacitación (Visconti, Moore, *et al.*, 1995; Visconti *et al.*, 2002; Naresh y Atreja, 2015; Navarrete *et al.*, 2015; Soriano-Úbeda *et al.*, 2019). Se ha evidenciado la aparición de pPKA fosforiladas a los 30 minutos de la incubación de espermatozoides de ratón en medio capacitante (en presencia

de calcio, bicarbonato y albúmina) (Visconti, Bailey, *et al.*, 1995; Visconti, Moore, *et al.*, 1995; Arcelay *et al.*, 2008). También se ha asociado el incremento de proteínas sustrato de PKA fosforiladas, con la capacitación de espermatozoides en ratones (Visconti, Bailey, *et al.*, 1995) y humanos (Carrera *et al.*, 1996). Estos estudios demostraron que la mayoría de los espermatozoides no capacitados no muestran un incremento de pPKA, mientras que la totalidad de los espermatozoides capacitados sí lo muestran, principalmente en la pieza media y pieza principal del flagelo (Carrera *et al.*, 1996). Se ha observado que dichas fosforilaciones coinciden temporal y espacialmente con la adquisición de funciones específicas de los espermatozoides (Leclerc *et al.*, 1997), y con cambios a nivel molecular, necesarios para el proceso de la capacitación, desarrollados después de la eyaculación o tras la incubación en medio capacitante (Travis *et al.*, 2001; Urner *et al.*, 2001; Urner y Sakkas, 2003).

Una vez activada, PKA inicia cascadas de señalización, en las que intervienen serin-treonin quinasas de la familia MAPQuinasas (principalmente Scr) y las proteínas AKAPa (Baldi *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2006; Battistone *et al.*, 2013; Naresh y Atreja, 2015). Las MAPQuinasas facilitan una segunda cascada de señalización con fosforilaciones de proteínas en residuos de tirosina (pY) (Pereira *et al.*, 2017), en las que también interviene el receptor del factor de crecimiento epitelial (*Epithelial Growth Factor Receptor*; EGFR) (Cohen *et al.*, 2004; Abou-haila y Tulsiani, 2009). EGFR también está implicado en la activación de PLC $\gamma$  (Breitbart *et al.*, 2010; Breitbart y Etkovitz, 2011), la cual produce la hidrólisis del fosfatidil-inositol difosfato (PIP $_2$ ) produciendo diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP $_3$ ), que intervienen como segundos mensajeros en distintos puntos de la funcionalidad espermática (**Fig. 1.4**).

Se ha demostrado que la cascada de pPKA, activa una segunda cascada de señalización identificable por la aparición de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina (pY) en espermatozoides de humanos (Leemans *et al.*, 2019), de caballos (Visconti y Kopf, 1998; Bosakova *et al.*, 2018; Paudel *et al.*, 2019), de ratones (Abou-haila y Tulsiani, 2009; Naresh y Atreja, 2015) y de otros mamíferos (Breitbart y Naor, 1999; de Lamirande y Gagnon, 2002). Algunos autores sostienen que esta segunda cascada también es favorecida por la progesterona y por PKC en espermatozoides de humanos y de toros (Breitbart y Naor, 1999;

Cohen *et al.*, 2004; Breitbart *et al.*, 2006), y que es necesaria para el proceso de la capacitación de espermatozoides de ratones y moruecos (revisado en Aitken *et al.*, 1997; de Lamirande *et al.*, 1997).

La cascada de pY se inicia de la siguiente manera (**figura 1.4**): Diversos inductores como progesterona, PKA o PKC activan a MAPKKK (Raf) (de Lamirande y Gagnon, 2002). Raf fosforila en residuos de serina y treonina a MAPKK (MEK), que a su vez, fosforila en residuos de treonina y tirosina a MAPK (ERK) (Chen *et al.*, 2005; Ryter *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). PKA activa a Raf mediante la cascada pPKA, mientras PKC lo realiza por medio de la activación del complejo Ras/RAF (Sakkas *et al.*, 2003; Urner y Sakkas, 2003). Algunos autores sugieren que las MAP quinasas también pueden ser activadas por las especies reactivas del oxígeno de manera directa, o vía PKC (Revelli *et al.*, 2001; O'Flaherty *et al.*, 2005; Jin y Yang, 2017). Una vez ERK está activa, fosforila a un conjunto de proteínas como Ras de la región post-acrosómica en los espermatozoides humanos (Naz, 1996; Baldi *et al.*, 2000) o de la pieza media de los espermatozoides de conejos y otras especies de mamíferos, donde cumplen su función como quinasas (revisado en Sakkas *et al.*, 2003; Urner y Sakkas, 2003). A su vez, ERK, MEK y las proteínas similares a MEK (proteínas MEK-like), continúan con la cascada de fosforilaciones entre las que se fosforilan PTK y otras proteínas encargadas de realizar la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina propias del final de la capacitación (pY) (Urner *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007; Awda y Buhr, 2010).

Si bien las proteínas pY aumentan en la región acrosómica y en el segmento ecuatorial de la cabeza (Sakkas *et al.*, 2003), el flagelo es el compartimento donde se localizan la mayoría de las fosforilaciones de pPKA y sobre todo de pY en humanos (Carrera *et al.*, 1996; Naz, 1996; Leclerc *et al.*, 1997), hámsteres (Si, 1999), ratas (Dematteis *et al.*, 2008), ratones (Kalab *et al.*, 1994; Urner *et al.*, 2001), simios y otros mamíferos (Urner y Sakkas, 2003). El incremento de pY ocurre inicialmente en la pieza principal y posteriormente en la pieza media del flagelo (Galantino-Homer *et al.*, 1997; Urner *et al.*, 2001), encontrándose baja proporción de dichas fosforilaciones en la cabeza y acrosoma (Breitbart *et al.*, 2005). Los estudios de Naz *et al.* (1996), muestran que el estado de fosforilación en residuos de tirosina y la ubicación de 4 proteínas varían según el estado de



capacitación en el que se encuentren, desplazándose desde el flagelo hasta el acrosoma (Naz, 1996). Dos de estas proteínas son miembros de la familia AKAP, de 82 y 97 kDa, que intervienen en la ruta metabólica de AMPc y en la movilidad de los espermatozoides de ratón (Carrera *et al.*, 1996). Entre las proteínas fosforiladas por pY, se encuentra la PLD, la cual, una vez fosforilada, realiza cambios en la polimerización de las actinas, que permite la reorganización del citoesqueleto necesario para los procesos de HA y RA (Knobil *et al.*, 1994; Tulsiani *et al.*, 1998; Cohen *et al.*, 2004; Breitbart *et al.*, 2006).

La duración y regulación de la capacitación, así como los estímulos necesarios para la RA y su desarrollo varían de unas especies a otras (Kim y Gerton, 2003), durando 60 min en los espermatozoides de ratón (Visconti, Bailey, *et al.*, 1995; Visconti, Moore, *et al.*, 1995), y aproximadamente 4 horas en humanos (Mbizvo *et al.*, 1990; Williams y Ford, 2001; Brukman *et al.*, 2018). Se ha determinado que los principales cambios de la capacitación de espermatozoides de ratón ocurren entre los 30 y 60 min de incubación en condiciones capacitantes.

#### **1.2.4. Relación entre capacitación, hiperactivación y reacción acrosómica**

Aunque la capacitación espermática se describió por primera vez hace más de medio siglo, todavía no existe una definición uniformemente aceptada de este proceso a nivel celular o molecular (Yanagimachi, 1994a; de Lamirande *et al.*, 1997). Como las diversas publicaciones no han sido capaces de determinar marcadores específicos que definan el proceso de la capacitación, se ha generado un debate sobre si es un proceso discreto y puntual, o progresivo, así como si la regulación de la capacitación se debe a una des-represión, o si, por el contrario, son eventos de maduración del potencial fecundador.

También se está debatiendo si algunos eventos que ocurren antes de la fecundación del óvulo, como son el desarrollo de la HA y la RA, forman parte de la capacitación o son eventos independientes (Visconti *et al.*, 1998; Visconti y Kopf, 1998). La mayoría de las publicaciones sugieren que tanto HA como RA, son eventos que ocurren en espermatozoides capacitados, y por lo tanto, pudieran formar parte del macroproceso de la capacitación, o al menos, procesos

dependientes de esta (Mortimer *et al.*, 1996; Baker *et al.*, 2006; O'Flaherty *et al.*, 2006a; Suarez, 2008; Allouche-Fitoussi *et al.*, 2019).

Se ha sugerido que el desarrollo de la capacitación genera los cambios necesarios para que tanto HA como RA puedan ocurrir (Márquez y Suarez, 2004; Suarez, 2008; Kwon *et al.*, 2014), y que existe relación entre el proceso de HA con fosforilaciones de proteínas en residuos de tirosina en los flagelos de diversas especies de mamíferos como humanos, bovinos, ratones y hámsteres (Si, 1999; Márquez y Suarez, 2004; Suarez, 2008; Allouche-Fitoussi *et al.*, 2019). Estas fosforilaciones se deben a las cascadas de fosforilación pPKA y pY de la capacitación que, en espermatozoides de ratones y humanos, se dan inicialmente en la pieza principal, y posteriormente en la pieza media, instantes antes de la HA (Sakkas *et al.*, 2003; Urner y Sakkas, 2003; Abou-haila y Tulsiani, 2009; Alasmari *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2017). Entre las proteínas fosforiladas durante la capacitación, las hexoquinazas, AKAPs y la proteína de unión a calcio regulada por pY (*Calcium binding and tyrosine phosphorylation-regulated protein; CABYR*) están asociados a la HA (revisado en Tulsiani *et al.*, 1997; Olivera *et al.*, 2006; Abou-haila y Tulsiani, 2009).

Algunas publicaciones sugieren que la desregulación de la latencia permite que se activen los elementos necesarios para que HA y la RA tengan lugar en momento adecuado, considerando cada uno de los eventos como independientes (Olds-Clarke, 1990). Esta hipótesis se refuerza con el hecho de que las fosforilaciones de proteína entre los procesos de capacitación, HA y RA se dan en lugares distintos dentro de la célula (de Lamirande y Gagnon, 1993a; Aitken *et al.*, 1998; Herrero *et al.*, 2000; Ford, 2004; O'Flaherty *et al.*, 2006a, 2006b; Roy y Atreya, 2008a; de Lamirande y O'Flaherty, 2008; Doshi *et al.*, 2012; O'Flaherty, 2015; Aitken, 2017). Además, la RA es un proceso irreversible dependiente del contacto con ZP, y con requerimientos de concentraciones de calcio y bicarbonato distintos de los necesarios para el desarrollo de la capacitación y de la HA, reforzando la idea de independencia entre la RA y la capacitación (Griveau, Renard, *et al.*, 1995; de Lamirande *et al.*, 1997; Suarez y Pacey, 2006; Stival *et al.*, 2016; Jin y Yang, 2017). Por ejemplo, en los espermatozoides de hámster, el incremento de calcio necesario para la HA (de

50 nM a una 100-200 nM) es menor que para la RA, donde se requieren concentraciones de 300 nM a 400 nM (Suarez and Dai, 1995), además, dichos incrementos de calcio ocurren en lugares distintos; flagelo y pieza media en el caso de capacitación e HA y cabeza en el caso de la RA, (Suarez, Drost, Redfern and Gottlieb, 1990; Suarez *et al.*, 1991).

Algunos autores señalan la necesidad de que algunas proteínas que son fosforiladas durante la capacitación, se desfosforilen para que se produzca la RA (Urner y Sakkas, 2003; Olivera *et al.*, 2006). Estas desfosforilaciones serían reguladas por fosfatasas que se inactivan durante los primeros eventos de la capacitación, y que se activan después de la HA (Urner y Sakkas, 2003; Olivera *et al.*, 2006). Existen evidencias de que tanto la HA (Anderson *et al.*, 1992, 1994) como la RA (Stival *et al.*, 2016), pueden ser inducidos *in vitro* en espermatozoides no capacitados, por ejemplo, mediante alteraciones en la membrana espermática o en los canales iónicos de los espermatozoides.

Otro debate sobre la capacitación implica la formación de especies reactivas (ER) por parte de los espermatozoides de los mamíferos, así como si dichas moléculas pudieran ser inductoras o facilitadores de la capacitación. La mayoría de los autores consideran que los espermatozoides no son capaces de producir o aprovechar los ER, sin embargo, las investigaciones de Aitken y colaboradores sostienen que los ER -principalmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- inhiben a algunos represores de la capacitación como las fosfatasas, y activan enzimas inductoras de la capacitación, como las quinasas, sugiriendo que los ER pueden ser efectores de los eventos postransduccionales que favorecen la capacitación (Fujinoki, 2013; Yang *et al.*, 2017; Bosakova *et al.*, 2018; Arroyo-Salvo *et al.*, 2019).

### 1.3. Hiperactivación

Cuando los espermatozoides atraviesan el cérvix y llegan al oviducto, se adhieren a las células epidérmicas del istmo. En este momento, se da un proceso de comunicación intercelular que, junto a la presencia de progesterona y los cambios de la concentración intraespermática de calcio, permiten el desarrollo del movimiento hiperactivado (Luque *et al.*, 2018).

La hiperactivación (HA) es un cambio en el patrón de movimiento de los espermatozoides capacitados (Yanagimachi, 1970; Cancel *et al.*, 2000; Goodson *et al.*, 2011; Mortimer y Mortimer, 2013), caracterizado por ser un movimiento no progresivo, con un batido flagelar vigoroso, asimétrico y de gran amplitud (Dunbar and O’Rand, 1991; Guraya and Sidhu, 1991; Yanagimachi, 1994b; Guraya, 2000), que da lugar a trayectorias de natación circulares o helicoidales (Suarez, Drost, Redfern, and Gottlieb, 1990; Suarez *et al.*, 1991; Demott y Suarez, 1992). La HA proporciona a los espermatozoides una mayor fuerza de empuje para desprenderse del epitelio oviductal (Suarez *et al.*, 1991; Suarez, 2008), nadar a través del medio viscoso del oviducto (Kay y Robertson, 1998), encontrar al óvulo y penetrar tanto la matriz del cúmulo que lo rodea (Chang y Suarez, 2011; Bosakova *et al.*, 2018; Arroyo-Salvo *et al.*, 2019), así como para atravesar la ZP después de la RA, (Ho y Suarez, 2001a; Eddy *et al.*, 2003; Allouche-Fitoussi *et al.*, 2019).

La HA se genera por cambios concretos en los transportadores de calcio propios de la pieza media (*CatSper*), que alteran el citoesqueleto del flagelo (Chang y Suarez, 2010; Suarez y Wu, 2016). Las investigaciones de Suarez y Chang sugieren que los espermatozoides HA requieren correcciones intermitentes de su trayectoria para poder llegar al óvulo, y que estas correcciones parecen ser dependientes de calcio (Márquez *et al.*, 2007; Chang y Suarez, 2011; Sánchez-Cárdenas *et al.*, 2018), ya que el movimiento HA “a favor de gancho” ocurre en presencia de calcio y es regulado por *CatSper*, mientras que el movimiento en sentido contrario al gancho ocurre cuando se da la liberación de calcio de sus reservas espermáticas (Chang, 1984; Ho y Suarez, 2001a; Visconti *et al.*, 2002).

En la **figura 1.3** se ilustran los distintos tipos de movimiento de los espermatozoides vigorosos.



**Figura 1.3:** Tipos de movimiento en espermatozoides de ratón: La imagen representa las trayectorias del movimiento de los espermatozoides de ratones, según captura en sistema CASA.

(A) El movimiento activado (verde) se caracteriza por tener trayectoria traslacional que conserva la simetría del movimiento, lo suficiente para permitir un movimiento progresivo (Mortimer y Mortimer, 1990; Mortimer *et al.*, 1997; Kay y Robertson, 1998).

(B) Los patrones de movimiento en tránsito hacia la hiperactivación (amarillo), son los movimientos "tipo helicoidal" o con "giros de alta curvatura", y corresponden a los movimientos de trayectoria transicional. Estos movimientos conservan la simetría lo suficiente para permitir el movimiento hacia delante de los espermatozoides, y finalizan con el movimiento HA o lo intercalan (Mbizvo *et al.*, 1990). Este movimiento puede definirse como "intermedios".

(C) El movimiento HA (rojo) muestra patrones de movimientos bifásicos no sincronizados, que cambian constantemente de un patrón de hiperactivación a otro, o de un estado "intermedio" a un patrón hiperactivo (Mortimer y Mortimer, 1990; Mortimer *et al.*, 1997; Kay y Robertson, 1998).

(D) El movimiento HA tipo "centrifugado de estrella" se caracteriza por tener muy baja linealidad, y es un tipo de movimiento encontrado en determinados experimentos *in vitro* empleando distintos elementos capacitantes como BSA, progesterona y calcio (Mbizvo *et al.*, 1990; Yanagida *et al.*, 1990) o radicales libres (de Lamirande y Gagnon, 1993a; Aitken *et al.*, 1996; de Lamirande y O'Flaherty, 2008).

#### 1.4. Exocitosis del gránulo acrosómico (Reacción acrosómica)

Los óvulos de mamíferos están rodeados por una envuelta granulosa folicular y por la ZP. La capa granulosa folicular en algunas especies se encuentra subdividida en el *cumulus oophorus* (una capa granulosa de células foliculares) y la *corona radiata interior* (revisado en Sidhu y Guraya, 1989; Oura y Toshimori, 1990; Dunbar y O'Rand, 1991; Guraya, 2000). La ZP es la capa más externa del óvulo maduro de mamíferos, y está compuesta por varias glicoproteínas agrupadas en tres familias (ZP1, ZP2 y ZP3), que permiten la unión del espermatozoide capacitado con dicha envuelta, y son uno de los inductores de la señalización celular que desencadena la RA (Roldan y Harrison, 1990; Roldan y Mollinedo, 1991; Roldan y Murase, 1994; Garde y Roldan, 2000; Márquez y Suarez, 2004). Para que la fecundación tenga lugar, el espermatozoide debe atravesar tanto al *cumulus oophorus* como la ZP, lo que requiere la exocitosis del contenido del acrosoma (Guraya, 2000).

El gránulo acrosómico (acrosoma), es una gran vesícula derivada del aparato de Golgi, que se encuentra cubriendo la región anterior del núcleo (Abou-haila y Tulsiani, 2009). El acrosoma tiene similitudes con los lisosomas, en especial por su contenido enzimático y su medio ácido (Guraya, 1987, 2000; Oura y Toshimori, 1990), y actúa como reservorio de calcio (Abou-haila y Tulsiani, 2009). Esta vesícula está formada por una membrana acrosómica externa (OAM), y por una membrana acrosómica interna (IAM). La OAM está rodeada por la MP, mientras que la IAM está en estrecha asociación con la membrana nuclear (Kopf, 1990; Roldan y Mollinedo, 1991; Roldan y Harrison, 1993; Fléchon, 2016). La luz del acrosoma tiene componentes solubles y un compartimento de partículas conocido como matriz acrosómica, que contiene enzimas hidrolíticas como hidrolasas, proteinasas, esterasas, sulfatasas, hialuronidasa, neuraminidasa, proacrosinas/acrosinas, fosfatasas, fosfolipasas C y A<sub>2</sub> (Sidhu y Guraya, 1989; Guraya y Sidhu, 1991; Yanagimachi, 1994b; Tulsiani *et al.*, 1998), y metaloproteasas, que al liberarse, permite que los espermatozoides atraviesen el *cumulus oophorus* (Roldan y Harrison, 1990, 1993; Roldan y Mollinedo, 1991).

La secreción del contenido acrosómico es un proceso de exocitosis intensamente regulado, que implica la fusión de OAM con la MP (De La Vega-Beltran *et al.*, 2012). Según algunos autores, la RA se da en espermatozoides capacitados debido a diversas señales extracelulares, como la hiperpolarización de la MP (Fléchon, 2016), presencia de hormonas, niveles extracelulares de calcio y pH adecuados, y otras señales que se encuentran en presencia del *cumulus ooforus* (revisado en Kopf, 1989; Stock y Fraser, 1989; Mitchell *et al.*, 2007; Visconti *et al.*, 2011).

La capacitación de los espermatozoides del ratón está asociada con la hiperpolarización del potencial de la membrana celular, debida a los cambios en la concentración del sodio y del calcio intracelular (disminución e incremento, respectivamente) (De La Vega-Beltran *et al.*, 2012). Se ha sugerido que ésta hiperpolarización está inducida por agonistas fisiológicos (por ejemplo, zona pelúcida solubilizada) y que es un evento muy relevante para la reacción del acrosoma en espermatozoides de ratón (Abou-haila y Tulsiani, 2009). En la **figura 1.4** se muestra un esquema de la reacción acrosómica.

En la ampolla del oviducto de diversos mamíferos, la presencia de componentes como la progesterona y elementos de la ZP, activan a los receptores de EGFR y de ZP (ZP3-R), lo que induce vías de señalización, en las que el calcio interviene como un segundo mensajero, en espermatozoides de carnero (Roldan y Vazquez, 1996), jabalí (Yuan *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2005), cobaya (Murase y Roldan, 1996; Nixon *et al.*, 2006), ratón (Naz, 1996; O'Toole, Roldan y Fraser, 1996; O'Toole, Roldan, Fraser, *et al.*, 1996; O'Toole, Roldan, Hampton, *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2012), humano (Roldan y Harrison, 1993; Roldan *et al.*, 1994; Breitbart y Naor, 1999; Roldan y Shi, 2007; Boerke *et al.*, 2008), y otros mamíferos (Naz, 1996; Breitbart y Naor, 1999; Naz y Rajesh, 2004; Boerke *et al.*, 2008). Se ha demostrado la existencia de hasta tres incrementos del calcio intraespermático inmediatamente antes de la RA, al menos en espermatozoides de ratón (Stock y Fraser, 1989; Rossato *et al.*, 2001) y humano (Murase y Roldan, 1996; Yuan *et al.*, 2001).

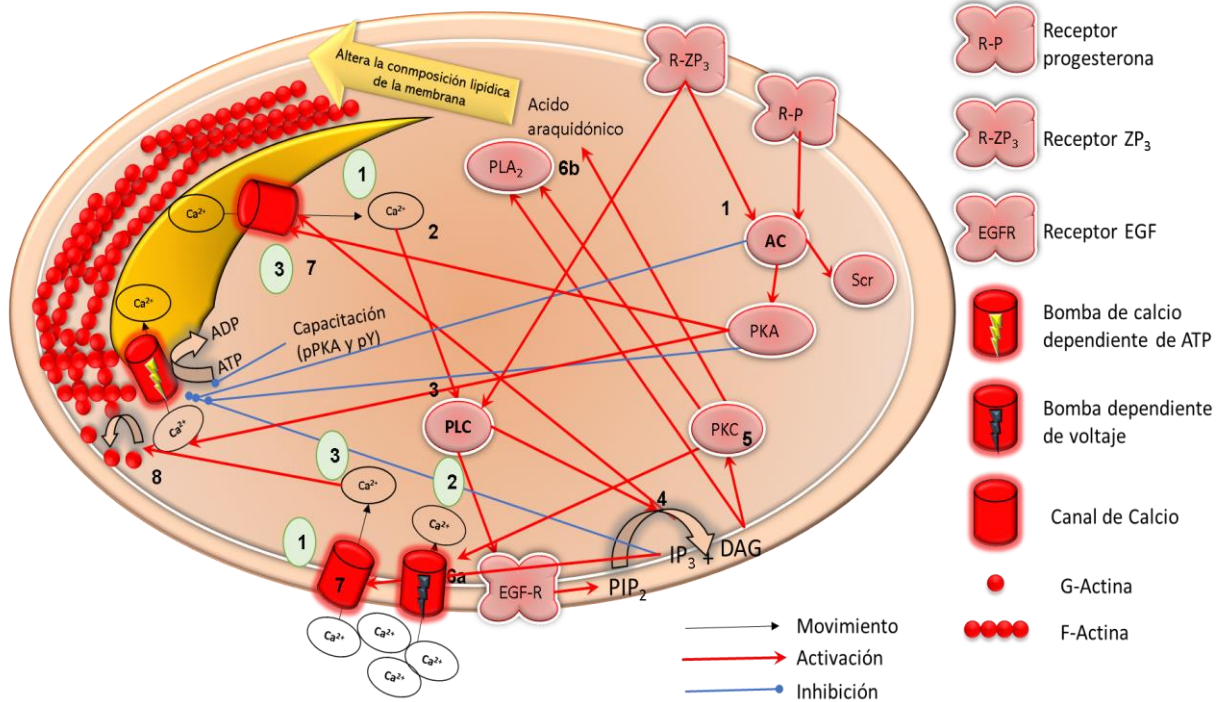
La F-actina formada durante la capacitación, establece una barrera entre la OAM y la MP que impide la fusión de ambas membranas, y mantiene anclada a PKC

(Breitbart *et al.*, 2005; Etkovitz *et al.*, 2007). Posteriormente, tras el tercer incremento de calcio asociado a la RA, ocurre su despolimerización (formación de G-actina) en la cabeza espermática, mediada por la activación de PLA<sub>2</sub> (Abou-haila y Tulsiani, 2009). Esta despolimerización permite que ocurra la fusión de membranas y la exocitosis controlada del contenido acrosómico (Cohen *et al.*, 2004; Breitbart *et al.*, 2005; Breitbart y Etkovitz, 2011). Una vez suceden todos los eventos de la RA, la fusión de membranas ocurre de manera ordenada en los distintos dominios de membrana, permitiendo que el contenido acrosómico se libere lentamente (Kim y Gerton, 2003).

La exposición de los espermatozoides capacitados tanto a la progesterona como a ZP3, está asociado a un incremento de pY, tanto en la cabeza (Urner *et al.*, 2001), como en el cuello y la pieza principal (Sakkas *et al.*, 2003). Se ha observado que un retraso en la aparición de dichas fosforilaciones en los espermatozoides de ratón, ocasiona la incapacidad de penetrar el óvulo (Urner *et al.*, 2001). Estos retrasos aparecen ante la ausencia de glucosa tanto en ratón (Urner y Sakkas, 1996a, 1996b; Urner *et al.*, 2001) como en humanos (Mahadevan *et al.*, 1997; Barak *et al.*, 1998). Entre las proteínas que sufren dichas fosforilaciones se encuentran la calmodulina, la cual está asociada a los procesos de fusión de MP y a las vías de señalización dependientes de calcio (Tulsiani y Abou-Haila, 2001; Abou-haila y Tulsiani, 2009).

A pesar de la exhaustiva regulación de la RA, se ha observado que en un elevado número de espermatozoides se produce un efecto descrito como “reacciones acrosómicas espontáneas” (Stival *et al.*, 2016), es decir RA que ocurren sin contacto con el óvulo (Kim y Gerton, 2003). Estas RA espontáneas parecen depender del calcio intracelular (Kim y Gerton, 2003; Stival *et al.*, 2016), y no de otros componentes como la concentración de progesterona, o de la presencia de componentes del ZP o del óvulo en el entorno (Kim y Gerton, 2003). Se ha identificado que, en aquellos espermatozoides que sufren RA espontánea, el citoesqueleto está organizado de manera distinta al de aquellos espermatozoides con una RA dependiente de ZP/progesterona (Stival *et al.*, 2016; Bosakova *et al.*, 2018). Cabe señalar que los espermatozoides que experimentan RA espontánea pierden potencial fecundante y no se ha demostrado que este tipo de RA tenga alguna función biológica (Kopf, 1989).





**Figura 1.4:** Esquema del desarrollo de la reacción acrosómica. Los números indican los diversos pasos. Los números en círculos enumeran los grandes incrementos de calcio asociados a RA.

Durante la capacitación se inactiva parcialmente una bomba de calcio dependiente de ATP que introduce el calcio intracelular de la cabeza del espermatozoide hacia el interior del acrosoma, y se induce la polimerización de la actina globular (G-actina) en fibras de actina (F-actina), que generan una barrera para prevenir la fusión de membranas y permitir el anclaje de proteínas de membrana en la MP de la región acrosómica (Breitbart *et al.*, 2005; Etkovitz *et al.*, 2007; Breitbart y Etkovitz, 2011). Cuando los espermatozoides capacitados entran en contacto con las glicoproteínas de la ZP y con la progesterona, sus receptores activan a la AC (1) (Uner *et al.*, 2001; Sakkas *et al.*, 2003; Uner y Sakkas, 2003), produciendo AMPc, lo que desencadena una cascada de fosforilaciones de proteínas por medio de PKA y Scr. Tanto AC como PKA contribuyen a la inactivación del canal de calcio dependiente de ATP del acrosoma, y PKA, a su vez, activa una bomba de calcio que permite la salida de calcio desde el acrosoma (2), ocasionando un primer incremento de calcio intraespermático (Breitbart y Naor, 1999).

Este incremento causa la activación de PLCβ y PLCγ (3) (Uner *et al.*, 2001; Olivera *et al.*, 2006). PLCγ activa a EGFR, que induce la movilización de PIP<sub>2</sub> y, posteriormente, ambas PLC hidrolizan PIP<sub>2</sub> en DAG e IP<sub>3</sub> (4). DAG activa a PKC (5), la cual activa una bomba de calcio dependiente de voltaje (6a), y junto con DAG activa a PLA<sub>2</sub> (6b) (Breitbart y Spungin, 1997; Breitbart *et al.*, 2006, 2010; Allouche-Fitoussi *et al.*, 2019).

PLA<sub>2</sub> permite la dispersión de F-actina mediante la activación de proteínas dependientes de calcio (Breitbart *et al.*, 2005; Etkovitz *et al.*, 2007). PKC también genera ácido araquidónico y sus derivados, que junto con PLA<sub>2</sub>, alteran la composición lipídica de la MP, y generan cambios en los componentes del citoesqueleto, causando su reorganización cuando las concentraciones de calcio son adecuadas (Abou-haila y Tulsiani, 2009; Kumaresan *et al.*, 2012). La apertura del canal de calcio dependiente de voltaje (6b), ocasiona un segundo incremento de calcio. Entonces IP<sub>3</sub> inhibe completamente la bomba de calcio dependiente de ATP del acrosoma, y activa la bomba de calcio del acrosoma, y al canal de calcio de la MP CCE (7), causando el tercer incremento del calcio necesario para la despolimerización de actina (8), permitiendo la exocitosis del acrosoma mediante la fusión de membranas (Sakkas *et al.*, 2003; Uner y Sakkas, 2003).

### 1.5.Regulación iónica de la función espermática

Algunos elementos como hormonas, glucosa, iones y ATP, son inductores de la señalización celular. Al igual que en las células somáticas, los espermatozoides están regulados por eventos de señalización celular, pero únicamente de tipo postransduccional (Wong *et al.*, 2001; Colagar *et al.*, 2009; Valsa *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2016; Hashemi *et al.*, 2018).

Diversas investigaciones han concluido que algunos iones como calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), o zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ), así como potasio ( $\text{K}^+$ ), e hidrógeno ( $\text{H}^+$ ), se encuentran en bajas concentraciones dentro del líquido seminal y están implicados en la regulación de la función espermática (Visconti, Bailey, *et al.*, 1995; Visconti, Moore, *et al.*, 1995; Carrera *et al.*, 1996; Baldi *et al.*, 2000; Visconti *et al.*, 2002; Jaiswal y Conti, 2003; Tulsiani *et al.*, 2007). Estos autores sugieren que debido a la permeación de la MP ocurrida al inicio de la capacitación, aumenta el tránsito de cationes hacia el interior celular. El influjo de cationes ocasiona cambios en el potencial de membrana, y en la funcionalidad espermática debida a la activación de señales celulares tanto en el citosol como en el flagelo (Olivera *et al.*, 2006).

De todos los iones anteriormente mencionados, el calcio ha sido el más estudiado, por ser necesario tanto en el proceso de la capacitación (Márquez y Suarez, 2004), como para el desarrollo de HA (Bennet *et al.*, 1987; Storey *et al.*, 1992; Brewis *et al.*, 2001; Witte y Schäfer-Somi, 2007; Florman *et al.*, 2008; Abou-haila y Tulsiani, 2009) y de la RA en distintas especies de mamíferos (Berridge *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2019; Stewart y Davis, 2019).

#### 1.5.1. El calcio

El calcio es un metal alcalinotérreo muy abundante en los seres vivos. Probablemente sea uno de los metales de mayor importancia biológica en los vertebrados, ya que interviene en multitud de eventos como son la formación de huesos, en la contracción muscular, reemplazando al sodio en su papel de mineral despolarizante (corazón), en la reorganización del citoesqueleto y participa como segundo mensajero en multitud de procesos celulares como son la división, migración y diferenciación celular, la apoptosis (Berridge *et al.*, 2000),

la reorganización del citoesqueleto, eventos de intercambio iónico, y estabilización de algunas proteínas (Hollis, 2018; Stewart y Davis, 2019).

Existen multitud de enzimas y proteínas implicadas en la señalización celular, que tienen relación con el calcio, entre las que se encuentran enzimas de la familia fosfolipasa (PLA), calmodulina, calcineurina, calreticulina, AC, y receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (Berridge *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2019). La mayoría de las señales dependientes de calcio son reguladas por la concentración intracelular del catión, o por su concentración en compartimentos concretos dentro de la célula (Luque *et al.*, 2018).

#### **1.5.1.1. Papel del calcio en la funcionalidad espermática**

El calcio, el bicarbonato y la albúmina, tienen un papel fundamental en la funcionalidad espermática (Au *et al.*, 2015; Stewart y Davis, 2019). La señalización por calcio es imprescindible para los procesos de reproducción sexual y desarrollo embrionario (Correia *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017; Brukman *et al.*, 2018; Luque *et al.*, 2018), así como en la regulación de la cinética espermática (Guraya, 2000; Turner, 2006; Sánchez-Cárdenas *et al.*, 2018), desarrollo de la capacitación (Baldi *et al.*, 2000; Tulsiani *et al.*, 2007; Navarrete *et al.*, 2015), en la adquisición de HA (Márquez y Suarez, 2004; Márquez *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2017; Sánchez-Cárdenas *et al.*, 2018) y en el desarrollo de RA (Rossato *et al.*, 2001; Dematteis *et al.*, 2008; Lishko *et al.*, 2012).

Diversas publicaciones corroboran a las citadas anteriormente, al señalar que en ausencia de calcio no se da espermatogénesis, llegando a ocurrir hiperplasia testicular (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2006; Valsa *et al.*, 2015), y que los espermatozoides incubados en medios sin calcio sufran alteraciones negativas de su movilidad, retrasos en la capacitación y pérdida de la capacidad de desarrollar HA y RA, (Witte y Schäfer-Somi, 2007; Ren y Xia, 2010; Dressen *et al.*, 2018). Recientes publicaciones han relacionado bajas concentraciones de calcio en el líquido seminal con la infertilidad masculina (Darszon *et al.*, 2011; Banihani y Khasawneh, 2018; Beigi Harchegani *et al.*, 2019), con la disminución de la espermatogénesis y con el desarrollo de espermatozoides inmóviles o estériles (Lishko *et al.*, 2012; Allouche-Fitoussi *et al.*, 2019; Lim *et al.*, 2019).

Se ha descrito la presencia de una serie de reservorios y transportadores de calcio propios de los espermatozoides (June *et al.*, 2001; Piehler *et al.*, 2006; Márquez *et al.*, 2007; Kumaresan *et al.*, 2012), justificando la importancia del catión en los procesos de capacitación, HA y RA. Tanto las mitocondrias, como el acrosoma y la envoltura nuclear redundante (RNE: *Redundant Nuclear Envelopment*) son reservorios de calcio en espermatozoides (Florman *et al.*, 2008; Chang y Suarez, 2011; Amaral *et al.*, 2013). Se ha sugerido que la reserva de calcio del RNE, que se encuentra en la base del flagelo, es la más utilizada para el desarrollo de la hiperactivación, mientras que aquellas de las mitocondrias y del acrosoma son las utilizadas para la reorganización del citoesqueleto (Visconti, 2009), y para la RA (Rossato *et al.*, 2001). Tanto los reservorios como los transportadores de calcio de los espermatozoides están fuertemente regulados y permiten el correcto funcionamiento de los espermatozoides (Costello *et al.*, 2009; Correia *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2017; Brukman *et al.*, 2018; Orta *et al.*, 2018), mediante la reubicación del catión en el interior espermático a lo largo de la capacitación (Storey *et al.*, 1992).

Los reguladores de calcio varían entre la cabeza y la cola del espermatozoide, así como en base a la función que desempeña, de manera que se puedan dar señales concretas en los momentos oportunos (Visconti *et al.*, 2011; Luque *et al.*, 2018; Sánchez-Cárdenas *et al.*, 2018): Diversas publicaciones señalan que la concentración de calcio en el interior del acrosoma es muy elevada durante toda la capacitación, y que se llegan a registrar hasta 6 incrementos de la concentración de calcio intraespermática durante la capacitación, HA y RA (Storey *et al.*, 1992). Estos incrementos se deben a la entrada del catión tanto desde el exterior de los espermatozoides (líquido seminal y ambiente del oviducto) (Storey *et al.*, 1992; Rossato *et al.*, 2001; Ho y Suarez, 2003; Márquez *et al.*, 2007), como desde sus reservorios (Adeoya-Osiguwa y Fraser, 1993; Visconti *et al.*, 2011), activando a *CatSper*, por medio de PKA (Yeung y Cooper, 2008; Visconti *et al.*, 2011; Orta *et al.*, 2018).

Las investigaciones sobre el papel del calcio en la funcionalidad espermática publicadas entre 1985 y 1995 sugieren que una bomba de calcio dependiente de ATP de la MP de los espermatozoides ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa), presente en humanos, cobayas y toros, está regulada por las variaciones en puentes disulfuro

y lípidos al inicio de la **capacitación** (revisado en de Lamirande *et al.*, 1997; Leclerc *et al.*, 1997; Breitbart y Naor, 1999). Esta bomba participa en los procesos de la capacitación y la RA, modificando las concentraciones de los reservorios espermáticos de calcio, en base a las señales extracelulares que inducen la capacitación y la RA. Entre dichas señales se encuentra la fosforilación de la bomba por medio de PKA durante los primeros eventos de la capacitación, y la activación por medio de IP<sub>3</sub> durante la RA (Adeoya-Osiguwa y Fraser, 1993; Breitbart y Spungin, 1997; Breitbart y Etkovitz, 2011).

El calcio interviene en la **movilidad** espermática por medio de proteínas como la CaMquinasa IV (presente en el flagelo de espermatozoides humanos), canales iónicos, intercambiadores iónicos, canales dependientes de voltaje, de ATP o de IP<sub>3</sub>, calmodulina, entre otras. El calcio almacenado en el cuello de los espermatozoides, es la principal fuente de este catión asociada a la movilidad (Chang y Suarez, 2011). La calmodulina, interviene en la regulación de la movilidad, mediante la modulación calcio-dependiente de los batidos flagelares de los espermatozoides de los mamíferos, afectando al axonema por medio de proteínas de unión de los flagelos. Un ejemplo de estas proteínas, propias de mamíferos, es CABYR, la cual interviene en la HA (revisado en Pereira *et al.*, 2017). Por su parte, los niveles de calcio en el interior de los espermatozoides de los mamíferos están regulados por una ATPasa de la MP denominada PMCA4, la cual se encuentra en la pieza principal del axonema, e interviene en los procesos de movilidad, HA y fertilidad espermática (Suarez, 2008).

El calcio y los canales de calcio propios de los espermatozoides, son elementos imprescindibles para la adquisición del **movimiento HA** (revisado en Darszon *et al.*, 2011; Vicens Sánchez, 2014). *CatSper* es un complejo canal iónico de calcio, formado por 4+2 subunidades; las 4 subunidades principales (1 a 4), y las subunidades accesorias ( $\delta$  y  $\zeta$ ) (Stewart y Davis, 2019). Estos canales permiten el transporte de calcio a lo largo del flagelo y regulan su movimiento activo e hiperactivo. La ausencia de este canal, está asociado a espermatozoides inmóviles y subfértiles (revisado en Yeung y Cooper, 2008; Visconti *et al.*, 2011; Orta *et al.*, 2018). Con el incremento del pH y de calcio en el interior de los espermatozoides al inicio de la capacitación, se da la activación de *CatSper* por

medio de PKA (Xia *et al.*, 2007). Este aumento de calcio ocurre principalmente en la unión de la pieza intermedia con la pieza principal del flagelo, y entre la pieza media y la cabeza (Ho y Suarez, 2003; Chang y Suarez, 2011). Se ha sugerido que el calcio necesario para la HA es liberado desde el RNE (Chang y Suarez, 2011). El RNE tiene receptores de IP<sub>3</sub>, que se activan durante la capacitación e inducen la liberación del calcio almacenado en el RNE (revisado en Márquez y Suarez, 2007; Navarro *et al.*, 2008; Brukman *et al.*, 2018). Ese calcio, transportado por canales como *CatSper* a lo largo del flagelo, permite la regulación del movimiento HA (Qi *et al.*, 2007; Chang y Suarez, 2011; Allouche-Fitoussi *et al.*, 2019). Los canales *CatSper* se encuentran en la membrana de la pieza principal del flagelo, e intervienen en la regulación del citoesqueleto y del batido flagelar por medio de la movilización del calcio hacia el flagelo (Breitbart y Naor, 1999; Martin *et al.*, 2005; Dematteis *et al.*, 2008).

Algunos autores han identificado el calcio como un elemento fundamental para el desarrollo de la **reacción acrosómica** (Roldan y Fragio, 1993; Roldan y Harrison, 1993; Costello *et al.*, 2009), habiéndose registrado hasta tres incrementos del catión en el interior de los espermatozoides, relacionados con la restructuración del citoesqueleto (Stival *et al.*, 2016; Bosakova *et al.*, 2018).

Durante la capacitación, se inhibe la bomba de calcio dependiente de ATP que introduce al catión en el acrosoma, ello, junto a la apertura de un canal catiónico activado por el receptor de reconocimiento de la ZP3, ocasiona el primer incremento de calcio en el interior de los espermatozoides (Breitbart y Etkovitz, 2011), el cual permite la despolarización de la membrana y la activación de una proteína asociada a proteína G<sub>i</sub>, que aumenta el pH intracelular (ver **figura 1.4**).

Ambos cambios, activan a los canales de calcio dependientes de voltaje, que permiten el segundo incremento de calcio al interior del espermatozoide, el cual es mayor que en el primer caso (Abou-haila y Tulsiani, 2009; Breitbart y Etkovitz, 2011), así como la despolimerización de F-actina necesaria para la fusión de membranas (Abou-haila y Tulsiani, 2009). El tercer incremento de calcio, y más grande de los tres, está asociado a la actividad de PLC, mediante la apertura de canales de calcio, principalmente CCE, pero también TRCP, ambos eventos

mediados por  $IP_3$  (Toole *et al.*, 2000; Florman *et al.*, 2008), y por la salida del calcio almacenado en el acrosoma (Breitbart y Etkovitz, 2011).

Estos incrementos de calcio activan la señalización celular por medio de AC (Breitbart y Naor, 1999; Breitbart y Etkovitz, 2011), PKA, PKC y el receptor tipo ácido gamma aminobutírico A (GABA), de manera similar a como ocurre durante la capacitación (Sakkas *et al.*, 2003; Urner y Sakkas, 2003; Abou-haila y Tulsiani, 2009). También se ha identificado la participación de bombas de cationes durante los incrementos de calcio previos a RA, entre las que se encuentran la bomba de calcio dependiente de ATP en la OAM, así como ATPasas de calcio, magnesio y de sodio/potasio (Tulsiani *et al.*, 1998; Abou-haila y Tulsiani, 2009).

Debido a las complicaciones ocasionadas por la RA espontánea, los estímulos que movilizan el calcio acumulado en la región media encargado de regular la movilidad del espermatozoide, no deben activar el depósito acrosómico. Por ello, los mecanismos que regulan la movilización del calcio relacionado con la movilidad y aquel relacionado con la RA, son distintos (Márquez y Suarez, 2004; Whitaker, 2006; Tulsiani *et al.*, 2007). Se ha sugerido que el incremento de pH de la región del oviducto activa a proteínas G (Rab3A), las cuales inducen la liberación del calcio almacenado en el acrosoma. El calcio liberado activa la señalización celular por medio de DAG/PLA<sub>2</sub> (Whitaker, 2006).

#### **1.5.1.2. El carbonato cálcico amorfo**

Debido a la importancia del calcio a nivel fisiológico, diversas industrias han desarrollado diversos suplementos de calcio, tanto para la dieta como para medios de cultivo. Estos suplementos pueden ser de base orgánica o inorgánica (Meiron *et al.*, 2011).

Las sales de calcio son las fuentes de este catión más abundantes, y pueden estar formadas a base de carbonato o citrato. De entre ellas, el carbonato cálcico ( $CaCO_3$ ) es la sal más utilizada como fuente de calcio en la naturaleza (Straub, 2007). El  $CaCO_3$  es una de las sales más abundantes en la naturaleza, ya que se encuentra tanto en formaciones naturales como las rocas, como en animales y vegetales (corales, moluscos, crustáceos, algas, etc.).

Esta sal tiene 6 polimorfos conocidos; uno de ellos es el carbonato cálcico amorfo (ACC) el cual es una forma hidratada y amorfa, considerado como el polimorfo termodinámicamente más inestable de ellos, pero resultando 120 veces más soluble que la calcita (Nebel *et al.*, 2008; Meiron *et al.*, 2011). Debido a sus propiedades físico-químicas, algunos animales, como el cangrejo azul, utilizan el ACC como precursor metaestable de polimorfos cristalinos de  $\text{CaCO}_3$ , utilizándolo tanto de elemento estructural, como de almacén de calcio para otras funciones fisiológicas, así como para mejorar el transporte del calcio (Weiner *et al.*, 2003; Xiang *et al.*, 2014). Las propiedades fisicoquímicas del ACC le confieren de gran biodisponibilidad para el organismo (Qi *et al.*, 2014).

El estudio detallado de los mecanismos con los que los diferentes organismos estabilizan y usan este polimorfo, ha permitido crear un ACC estabilizado sintéticamente con el tampón PBS, aprovechando las propiedades estabilizadoras de ACC propias del ATP (Blumenthal *et al.*, 1977; Aizenberg *et al.*, 1996; Bentov *et al.*, 2010; Meiron *et al.*, 2011; Qi *et al.*, 2014). El ACC sintético se clasifica como un compuesto estable y transitivo, definido como  $\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Qi *et al.*, 2014; Cantaert *et al.*, 2017). Actualmente, este ACC sintético se utiliza como un suplemento alimenticio de calcio, puesto que tiene una excelente biocompatibilidad (Qi *et al.*, 2014), y supera a otros polimorfos de carbonato cálcico en su farmacocinética, biodisponibilidad (absorción intestinal y retención ósea), sin causar efectos adversos (Meiron *et al.*, 2011; Forsgren *et al.*, 2013; Shaltiel *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2014).

### **1.5.2. El magnesio**

El magnesio es el cuarto catión más abundante en el cuerpo, el segundo catión intracelular más abundante después del potasio, e interviene en multitud de procesos celulares y fisiológicos. Al igual que el calcio, el magnesio es un catión divalente perteneciente al grupo de los metales alcalinotérreos. En muchos tipos celulares, este catión actúa como antagonista de las señales mediadas por calcio (Al Alawi *et al.*, 2018), sin embargo, la información sobre el efecto del magnesio en los procesos de la fecundación y desarrollo embrionarios no son concluyentes (Herrick *et al.*, 2015; Hashemi *et al.*, 2018). Se ha evidenciado que el magnesio está relacionado con la estimulación de AC en células somáticas, así como con



el transporte activo de iones de calcio y potasio a través de las membranas celulares (Al Alawi *et al.*, 2018).

#### 1.5.2.1. Papel del magnesio en la funcionalidad espermática

El magnesio y el calcio antagonizan en muchas actividades fisiológicas, como son la regulación del estrés oxidativo, la reparación del ADN, la diferenciación celular y la proliferación, apoptosis y angiogénesis (revisado en Al Alawi *et al.*, 2018). Por ello, se ha sugerido que las funciones del magnesio en la espermatogénesis y funcionalidad espermática, pudieran ser opuestas a las del calcio (Wong *et al.*, 2001; Kasperczyk *et al.*, 2015; Babaknejad *et al.*, 2018; Hashemi *et al.*, 2018). Se ha relacionado la concentración intracelular de magnesio con el desarrollo de la glucólisis anaeróbica, con la liberación de energía y con la supervivencia espermática (Valsa *et al.*, 2012). También se ha determinado que el magnesio es un cofactor de la AC y de la superóxido dismutasa (Mg-SOD), y que interviene en procesos enzimáticos contra la toxicidad (Sørensen *et al.*, 1999; Kasperczyk *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2016).

La mayoría de las publicaciones exploran la relación entre la concentración del magnesio en el líquido seminal con la funcionalidad espermática, así como el efecto del catión incorporado en la dieta con la fertilidad en humanos no habiéndose encontrado publicaciones sobre el efecto del magnesio en la funcionalidad espermática a nivel celular. La bibliografía sugiere que el magnesio tiene efectos positivos sobre la fertilidad masculina, actuando en la espermatogénesis, evidenciando la correlación entre la concentración del catión en el líquido seminal con mejoras en la **movilidad** espermática (Valsa *et al.*, 2012). Se ha reportado que, durante la eyaculación, existe un incremento del magnesio intraespermático, cuyo origen son las glándulas prostáticas (Stock y Fraser, 1989).

Algunos investigadores probaron a sustituir el calcio del medio de cultivo espermático, utilizando otros cationes divalentes como el magnesio, sin conseguir suplir el efecto del calcio en la funcionalidad espermática. Estas publicaciones mostraron que el estroncio era capaz de soportar el desarrollo de la capacitación, pero no la RA, mientras que el resto de los cationes examinados,

como el magnesio o el bario, no mostraron relación con la capacitación, HA o la RA (revisado en Fakhri *et al.*, 1986; Hashemi *et al.*, 2018). Otras investigaciones tampoco encontraron relación entre el magnesio del líquido seminal y la movilidad espermática (Lindholmer y Eliasson, 1974), la supervivencia celular (Sørensen *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 2001), ni otros elementos de la funcionalidad espermática en espermatozoides humanos (Kasperczyk *et al.*, 2015; Valsa *et al.*, 2015, 2016; Liang *et al.*, 2016) o de otros mamíferos (Babaknejad *et al.*, 2018).

Por ello, se ha sugerido que el papel de este catión sobre la funcionalidad espermática se debe a ser cofactor de múltiples enzimas, principalmente en la regulación de la síntesis y uso del ATP y a su implicación en el sistema antioxidante, al ser cofactor de SOD y estimular la síntesis de *novoo* de glutatión, preservando a los espermatozoides del daño oxidativo (Babaknejad *et al.*, 2018). Algunos autores han relacionado la presencia de magnesio con la activación de la AC durante la RA (Leclerc y Kopf, 1995; Al Alawi *et al.*, 2018), si bien el potencial de este catión para activar la síntesis de AMPc vía AC en espermatozoides capacitados, es menor que la del manganeso (Mn), el cual es considerado efector de la RA (Leclerc y Kopf, 1995).

### 1.5.3. El zinc

El zinc ( $Zn^{2+}$ ) es un ion metálico presente en multitud de tipos celulares. Tiene dos propiedades que le hacen ser un elemento especial dentro de los metales IIB; por un lado, es un metal no tóxico del que no se han descrito patologías atribuibles a su acumulación excesiva. Por otro lado, tiene gran capacidad de unión a macromoléculas, permitiéndole adaptarse fácilmente a las necesidades de las proteínas y enzimas de las que forma parte (Vallee y Falchuk, 1993).

Al igual que el magnesio, el calcio o el selenio, es un “oligoelemento esencial”, es decir, un ion que se encuentra a muy bajas concentraciones dentro del organismo, pero que cumple funciones muy importantes. Los oligoelementos son ubicuos en todo el organismo, pero en el caso del zinc, sus niveles se encuentran muy elevados en el aparato reproductor masculino, siendo el segundo metal más abundante, después del hierro (Giacone *et al.*, 2016; Chu, 2018).

El zinc tiene funciones bien establecidas en la estabilización de la estructura y la actividad enzimática de multitud de proteínas como la superóxido dismutasa (Zn-SOD) o los factores de transcripción (Chu, 2018). Del mismo modo que el calcio y el magnesio intervienen en la regulación postransduccional de los espermatozoides, recientes investigaciones sugieren que el zinc pudiera tener una función similar (Fallah *et al.*, 2018; Hashemi *et al.*, 2018). El zinc participa en la regulación de la proliferación celular, la reproducción, la homeostasis, el sistema inmunológico y el sistema antioxidante de multitud de organismos (Babaknejad *et al.*, 2018). Interviene en multitud de funciones biológicas esenciales como la señalización y diferenciación celular (Vallee y Falchuk, 1993). El papel del zinc dentro de las células somáticas no se reduce sólo a la formación de elementos estructurales de unión celular a nivel molecular (los denominados dedos de zinc), si no a que se ha calculado que el 10% de las proteínas de mamíferos se unen a este metal (Cotrim *et al.*, 2019), formando parte de subunidades catalíticas, regulatorias o estructurales (Vallee y Falchuk, 1993).

#### **1.5.3.1. Papel del zinc en la funcionalidad espermática**

El zinc es un elemento esencial en la espermatogénesis y la fertilidad masculina. Según algunos autores, el suplemento alimenticio de zinc, mejora la calidad del semen, aumenta significativamente el volumen del esperma producido, y el porcentaje de espermatozoides de morfología normal, mejora la movilidad espermática, aumenta la tasa de éxito reproductivo, y se le considera necesario para la concepción, la implantación y el desarrollo del embarazo (revisado en Zhao *et al.*, 2016; Babaknejad *et al.*, 2018). La presencia del zinc y su movimiento intracelular no están bien caracterizados en los espermatozoides de los mamíferos (Kerns, Zigo, Drobnis, *et al.*, 2018). Algunos autores sostienen que el canal de protones dependiente de voltaje flagelar (HVCN1), es el principal mecanismo de extrusión de protones durante la capacitación en espermatozoides de los mamíferos, y que está implicado en los cambios de pH y en la concentración intraespermática de calcio. Ya que HVCN1 está regulado negativamente por el zinc, estos autores sugieren un papel importante de este metal en la represión y capacitación de los espermatozoides (Kerns, Zigo y Sutovsky, 2018; Kerns, Zigo, Drobnis, *et al.*, 2018; Sutovsky *et al.*, 2019). También se le atribuye la regulación de la capacitación por medio de alteraciones

de las proteínas espermáticas, al ser un cofactor del proteasoma 26S, una proteasa dependiente de ubiquitina que está implicada en la fecundación, desde la espermiogénesis, hasta la penetración de la ZP, incluyendo ciertos aspectos de la capacitación de los espermatozoides (Zimmerman y Sutovsky, 2009).

El aparato reproductor masculino tiene las concentraciones de zinc más altas de todo el organismo; mientras que el contenido de zinc en el tejido testicular es similar a la de otros órganos, el contenido de la glándula prostática, líquido seminal e incluso del eyaculado es mucho mayor (Vallee y Falchuk, 1993; Sørensen *et al.*, 1999). Recientes publicaciones señalan que el zinc incorporado en dieta, interviene en la activación de la hialuronidasa, inhibición del movimiento, hiperpolarización de la MP, prevención de la hiperactivación y de la formación de  $O_2^-$  debidas a la capacitación, así como cierta actividad antibacteriana en los espermatozoides humanos (Hadwan *et al.*, 2015; Narasimhaiah *et al.*, 2018; Alonge *et al.*, 2019).

Existen multitud de publicaciones que relacionan el efecto del zinc de la dieta sobre la reproducción. Todas estas publicaciones muestran bastantes contradicciones entre sí: Mientras que algunos autores encuentran concentraciones de zinc significativamente más altas en hombres fértiles, respecto a los infértiles (Giacone *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016; Fallah *et al.*, 2018; Hashemi *et al.*, 2018), o sugieren que la incorporación de suplementos orales de zinc mejoran la fertilidad de hombres con prostatitis crónica (Hadwan *et al.*, 2015; Narasimhaiah *et al.*, 2018; Alonge *et al.*, 2019), otros autores asocian altas concentraciones de zinc en los espermatozoides con mala calidad espermática, incluso la existencia de una correlación negativa entre la concentración de zinc en el flagelo y la movilidad espermática en humanos (Bittner *et al.*, 1999). Algunas investigaciones no encontraron relaciones significativas entre el nivel de zinc en plasma y la calidad del espermatozoides (revisado en Kasperczyk *et al.*, 2015; Narasimhaiah *et al.*, 2018). En ratas, la ausencia de zinc en la dieta causa atrofia de los túbulos seminíferos e impide el desarrollo de espermatozoides maduros (revisado en Colagar *et al.*, 2009; Chu, 2018).

El zinc puede actuar como inhibidor de la **capacitación**, por ser una molécula estabilizadora de la MP (Andrews *et al.*, 1994). Este metal, presente en el líquido

seminal, varía su presencia en la MP de los espermatozoides de manera similar a las variaciones de colesterol y colesterol-sulfato observadas durante la capacitación (Andrews *et al.*, 1994), es decir, aumenta durante la espermatogénesis y la maduración post-testicular en el epidídimo (Fallah *et al.*, 2018; Hashemi *et al.*, 2018), y va disminuyendo en la eyaculación, con la adquisición de la movilidad, a lo largo de la capacitación y tras la reacción acrosómica. En algunas especies, como los humanos, se ha demostrado el efecto inhibitor del zinc sobre la HA y RA, si bien este efecto no se ha encontrado en hámster ni en ratones (Riffo *et al.*, 1992; Andrews *et al.*, 1994).

Las investigaciones de Foresta (2014), muestran que los espermatozoides testiculares y epididimarios acumulan zinc en los residuos citoplasmáticos de las células espermáticas inmaduras, mientras que en los espermatozoides recién eyaculados, la concentración intracelular de zinc es menor, y el metal se localiza en la pieza media y flagelo, sugiriendo cierto papel represor del zinc sobre la capacitación durante la espermatogénesis (Foresta *et al.*, 2014; Chu, 2018). Estas publicaciones también reportan un efecto del zinc sobre la **movilidad** de los espermatozoides activos.

Algunos autores sostienen que se pueden determinar marcadores del proceso de la capacitación espermática en cerdo, toro y humano asociados al zinc (Kerns, Zigo, Drobnis, *et al.*, 2018; Sutovsky *et al.*, 2019). Estos marcadores se basan principalmente en la distribución del zinc dentro de la célula, en los distintos momentos de la capacitación (Kerns, Zigo, Drobnis, *et al.*, 2018), así como en el flujo del metal en la célula, en los momentos relacionados con la adquisición de HA y desarrollo de RA (Kerns, Zigo y Sutovsky, 2018). Estos perfiles de zinc indican que, inmediatamente tras la eyaculación, el zinc se encuentra principalmente en la cabeza de los espermatozoides, y se va desplazando hacia la pieza media durante la capacitación. Los espermatozoides hiperactivos, concentran su zinc en la pieza media, y durante la RA, la concentración de zinc intracelular disminuye drásticamente (Kerns, Zigo, Drobnis, *et al.*, 2018). La distribución del zinc dentro de los espermatozoides se explica, al considerar al zinc como un elemento fundamental para formar elementos estructurales, como los dedos de zinc que estabilizan la membrana mitocondrial y a la cromatina (Sutovsky *et al.*, 2019), así como para dar estabilidad a la unión entre la cabeza

y la cola espermática, (Vallee y Falchuk, 1993; Chu, 2018). Recientes publicaciones señalan que, en momentos previos a la RA, se eliminan los puentes de zinc, formándose enlaces disulfuro que reemplazan a los puentes de zinc, que causan la súper-estabilización de la cromatina, lo que facilita que ésta se descondense rápidamente, y se forme el pronúcleo masculino (Chu, 2018; Sutovsky *et al.*, 2019). Esto también favorece la desestabilización de la vaina mitocondrial, facilitando su degradación (Sutovsky *et al.*, 2019).

Algunas investigaciones revelan que los espermatozoides humanos obtenidos en la eyaculación, si son expuestos a agentes quelantes como el EGTA, alteran su estructura nuclear, ya que la ausencia de zinc interrumpe los puentes SH-Zn-SH intercalados entre las protaminas, lo que induce la descompactación de la cromatina (Foresta *et al.*, 2014; Fallah *et al.*, 2018). También se ha sugerido que el zinc pudiera intervenir en la señalización de la degradación de proteínas que tiene lugar durante los eventos de la capacitación, HA y RA. Esto podría deberse a que el zinc interviene como segundo mensajero y es cofactor de las enzimas proteasas que degradan a las proteínas durante el evento de la ubiquitinación (Zimmerman y Sutovsky, 2009), inicialmente descrito en espermatozoides de cerdo (Purdy, 2008) y de humanos (Kerns, Zigo y Sutovsky, 2018; Allouche-Fitoussi *et al.*, 2019).

A nivel molecular, se ha identificado que algunas proteínas implicadas en la penetración de la ZP y fusión gamética, metaloproteasas, la superóxido dismutasa y otras proteínas relacionadas con la funcionalidad espermática, son zinc-dependientes (Sutovsky *et al.*, 2019). Por ello, se ha sugerido que el zinc intraespermático también podría actuar como segundo mensajero en alguna vía de señalización en procesos de la funcionalidad acrosómica, como es la adquisición de la movilidad. No obstante, los detalles moleculares de cómo podría actuar el zinc y su relación con la funcionalidad espermática no están definidos, y las investigaciones son poco concluyentes; algunas sugieren que el zinc tiene efecto negativo sobre la movilidad espermática y la HA, mientras que otras indican no haber encontrado correlación entre el zinc y la natación de los espermatozoides (Sørensen *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2016; Chu, 2018).

Respecto a la **hiperactivación**, el zinc es un represor de HVCN1, el cual regula a *CatSper*. HVCN1 se encuentra bloqueado por zinc en los espermatozoides no capacitados, impidiendo el flujo de calcio y la alcalinización citoplasmática necesaria para el desarrollo tanto de HA como de RA (Sutovsky *et al.*, 2019). Además, este canal está colocado de forma asimétrica, probablemente proporcionando diferentes ambientes y gradientes alcalinizados en relación con los canales *CatSper* posicionados simétricamente, siendo posiblemente responsable de la flexión flagelar asimétrica durante la hiperactivación (Kerns, Zigo y Sutovsky, 2018). Recientes investigaciones indican que, en el proceso de la capacitación de espermatozoides de toros y humanos, está involucrado GPR39, un receptor de zinc acoplado a proteína-proteína G, localizado principalmente en el flagelo. En presencia de bajas concentraciones de zinc, GPR39 estimula el desarrollo de la HA, por medio de una cascada de señalización en la que participan la AC-transmembrana, PKA-Src-EGFR-fosfolipasa C y *CatSper* (Allouche-Fitoussi *et al.*, 2019).

Se ha sugerido que el zinc también interviene en el control de la fluidez lipídica, y en la estabilidad de las membranas plasmáticas de los espermatozoides, de manera dependiente de la capacitación, y relacionado con la RA (Michailov *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2016). Esto se debe a que los iones de zinc reaccionan con los grupos sulfhidrilo de la cisteína de las lipoproteínas y metaloproteínas de la membrana espermática (Kerns, Zigo y Sutovsky, 2018). No tenemos conocimiento que, hasta la fecha, se haya publicado algún estudio en espermatozoides de ratón, que relacionen el papel del zinc sobre la funcionalidad espermática y lo investiguen a nivel celular o molecular.

## 1.6. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y la función espermática

### 1.6.1. Las especies reactivas

Las especies reactivas (ER) son moléculas con uno o más electrones desapareados en sus capas atómicas más externas (Sharma y Agarwal, 1996; IUPAC, 1997; Doshi *et al.*, 2012). Estas moléculas se denominaban anteriormente “radicales libres” y actualmente se considera que la palabra “libre” es redundante y sobrante según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) (IUPAC, 1997). Estos elementos son muy reactivos, ya que tienden a captar electrones de las moléculas susceptibles de su entorno (IUPAC, 1997), y a propagar la oxidación mediante una reacción en cadena que genera mucho estrés oxidativo (Doshi *et al.*, 2012).

Las ER son elementos con una vida media muy corta y elevada reactividad. Estos elementos se nombran en función del átomo central que posee el electrón desapareado, de este modo, encontramos “especies reactivas del nitrógeno” (radicales nitrogenados; RNS), “especies reactivas centradas en el oxígeno” (radicales oxigenados; ROS), centrados en un átomo de halógeno (radicales halogénicos) o centrados en átomos de metal (IUPAC, 1997).

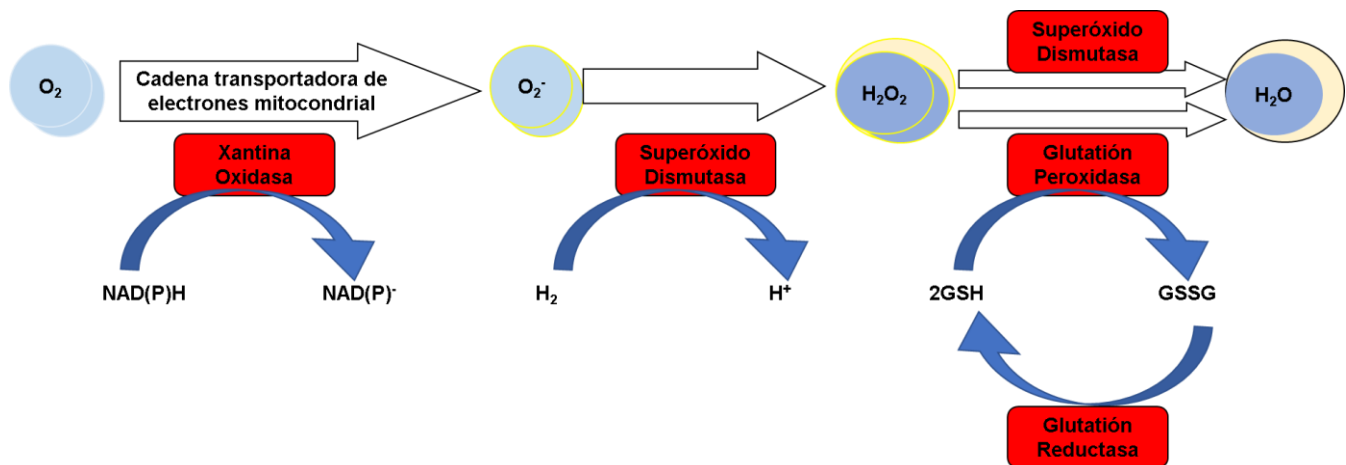
La reacción de oxidación de moléculas biológicas causada por ER se denomina “ataque oxidativo”, y es causante de problemas fisiológicos que afectan a lípidos, proteínas e incluso ácido nucleico (IUPAC, 1997). Los espermatozoides son muy susceptibles a los ataques oxidativos, debido a la alta presencia de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs: *polyunsaturated fatty acids*) en sus membranas plasmáticas (Costantini *et al.*, 2010). Los ataques oxidativos también pueden afectar funcionalmente a diversas proteínas (Davies, 1987), causar modificaciones citoesqueléticas (Hinshaw *et al.*, 1986), alterar vías de señalización celular, e incluso, la ruptura parcial del ADN mitocondrial y nuclear (Comporti, 1989; Doshi *et al.*, 2012; Guerriero *et al.*, 2014).

Aunque no todas las ER actúan de agentes oxidantes, los ROS y RNS son potentes agentes oxidantes a nivel fisiológico, que causan ataques oxidativos a moléculas de interés biológico (Costantini *et al.*, 2010). Su exceso genera estrés



oxidativo (EO) pudiendo causar daño oxidativo (DO) a nivel celular y tisular (IUPAC, 1997). De entre los ROS más conocidos se encuentran el superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), los radicales derivados del superóxido, el radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ), y otros compuestos altamente oxidantes que no son radicales, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el ozono ( $O_3$ ), los hidroperóxidos lipídicos y otros peróxidos (Sharma y Agarwal, 1996; Doshi *et al.*, 2012).

El  $O_2^{\cdot-}$  es una especie muy reactiva, con una vida media muy breve, incapaz de difundir por la MP, y que es producto natural de la respiración celular (Guerriero *et al.*, 2014). El  $H_2O_2$  tiene una vida media larga, es muy reactivo y tiene la capacidad de difundir libremente por las membranas plasmáticas, pudiendo generar ataques oxidativos en sitios distintos al lugar donde se ha producido (Sharma y Agarwal, 1996; IUPAC, 1997; Doshi *et al.*, 2012). Las principales dianas de los ROS son los lípidos, formando peróxidos lipídicos (LPO), así como las proteínas y el ADN (Guerriero *et al.*, 2014). La relación entre los ROS y las enzimas del sistema antioxidante se encuentra en la **figura 1.5**.



**Figura 1.5:** Esquema de la formación de ROS en células eucariotas y participación de enzimas del sistema antioxidante.

### 1.6.2. Papel de ROS en la función celular

El DO puede causar daños reversibles en el organismo, por la inhibición de procesos celulares y muerte celular (Sharma y Agarwal, 1996; Doshi *et al.*, 2012). Las membranas plasmáticas pueden fragmentarse por el ataque oxidativo a sus PUFAs, formando LPO, lo que ocasiona pérdida en la fluidez de membrana y alteraciones en la señalización celular. Los ROS también pueden cambiar el funcionamiento de algunas proteínas de manera permanente. En los casos más graves, el DO puede afectar al núcleo, ocasionando la fragmentación del ADN (Sharma y Agarwal, 1996; Doshi *et al.*, 2012).

En concentraciones controladas, los ROS pueden participar en la señalización celular, activando una gran cantidad de cascadas de señalización, regulando las fosfatasa (Goldman *et al.*, 1992), activando la ruta de las MAPquinasas, y actuando como segundos mensajeros (Thannickal y Fanburg, 2000; Waris y Ahsan, 2006; Ryter *et al.*, 2007; Deavall *et al.*, 2012). En las células somáticas, el estrés ambiental o celular activa las rutas de señalización celular en las que ROS interviene, determinando el balance entre supervivencia o muerte celular (Thannickal y Fanburg, 2000; Blaser *et al.*, 2016), o regulando la diferenciación celular (Murakami y Motohashi, 2015).

Diversos estudios demuestran la presencia de ROS como segundo mensajero en testículos, regulando la proliferación de las células germinales masculinas y la espermatogénesis (Akingbemi, 2005; Aitken, 2008; Shi *et al.*, 2010; Guerriero *et al.*, 2014). Para que la cantidad de ROS en el organismo esté controlada, y evitar el DO, se requiere el sistema antioxidante.

### 1.6.3. El sistema antioxidante

El sistema antioxidante (AO) es un conjunto de componentes capaces de reducir los ER, y de revertir el DO causado por los mismos (Costantini *et al.*, 2010; Costantini, 2014). Este sistema está formado por elementos enzimáticos y no enzimáticos, que funcionan complementándose entre sí (Cecarini *et al.*, 2007; Guerriero *et al.*, 2014).

La catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD), son dos enzimas del sistema AO, que mediante una reacción redox transforman a los ROS en compuestos estables: SOD cataliza la dismutación de dos iones peróxido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mientras que CAT cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en una molécula de agua y una de oxígeno (Devasagayam *et al.*, 2004). SOD es dependiente de zinc (Zn-SOD), cobre (Cu-SOD) y magnesio (Mg-SOD) (Floreani *et al.*, 2002; Rasool *et al.*, 2014).

Otra parte fundamental del sistema AOs son la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión S-transferasa (GST), que permiten la reducción de ER reaccionando con los hidroperóxidos de los ácidos grasos usando grupos tiol como donantes de electrones (Sharma y Agarwal, 1996; Guerriero *et al.*, 2014) Se ha demostrado la presencia de PHGPx en testículos de ratones (células de Leydig), así como en el citoplasma de las espermátidas redondas y en las mitocondrias de los espermatozoides (Guerriero *et al.*, 2014). Las GPx forman un sistema con las enzimas glutatión-reductasa, permitiendo el funcionamiento del glutatión reducido como AO, cuya presencia se ha evidenciado en los espermatozoides de mamíferos (Alvarez y Storey, 1989; Sharma y Agarwal, 1996).

Existen componentes no enzimáticos, como el magnesio y el zinc, que bloquean el efecto oxidante de los ROS, tanto en células somáticas como germinales (Guerriero, Ferro, Russo, 2004; Beckett, 2005). Estos elementos de ROS están presentes en el líquido seminal, y actúan de *scavengers*, es decir, mediante la captura de electrones desapareados y de ROS, así como mediante el impedimento de formación de nuevos radicales (Sharma y Agarwal, 1996).

#### **1.6.4. Sistemas antioxidantes en espermatozoides**

Múltiples investigaciones apuntan a la presencia de sistema AOs (tanto enzimático como no enzimático) en espermatozoides de humanos y otras especies de mamíferos: Diversos autores han demostrado la presencia de CAT y otros AOs en espermatozoides (Bai y Cederbaum, 2001; O'Flaherty, 2014a) así como la presencia de SOD y el sistema GSH/GSSG en las mitocondrias espermáticas (revisado en Garcez *et al.*, 2010; Guerriero *et al.*, 2014; O'Flaherty, 2014a). Algunas investigaciones realizadas en espermatozoides de toro, caballo,

ciervo, ratón y humano señalan que la incubación de este tipo de células en presencia de AOs (especialmente CAT), protege la cromatina y mejora la viabilidad, la movilidad espermática, la calidad del ADN y el desarrollo de RA (Chi *et al.* 2008; Garcez *et al.* 2010; Moubasher *et al.* 2013; Mohammadzadeh *et al.* 2019), evidenciando el sistema AOs en espermatozoides de los mamíferos y el efecto negativo de ROS en los mismos (Jeulin *et al.*, 1989; Lewis *et al.*, 1994; Aitken, Buckingham, *et al.*, 1995; Sharma y Agarwal, 1996; Potts *et al.*, 2000). También se han encontrado moléculas con actividad similar a CAT y a SOD (compuestos “SOD-like CAT-like”, que intervienen como *scavengers* de ER), en el semen de algunas especies de mamíferos. Entre ellas se encuentran la albúmina, piruvato, taurina, hipotaurina, vitaminas C y E y otras pequeñas moléculas (Aitken y Clarkson, 1988; de Lamirande y Gagnon, 1992; Sharma y Agarwal, 1996). Se ha demostrado que CAT y GPx se encuentran en baja concentración en espermatozoides humanos, haciéndolos sensibles a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A su vez, se ha probado que la actividad CAT-like, confirmada en espermatozoides de distintos mamíferos, aumenta en los espermatozoides que producen ROS, o que se encuentran en estados de estrés y daño oxidativo. No se han encontrado evidencias de variaciones en la actividad SOD-like de los espermatozoides en un estado de estrés o de daño oxidativo, en comparación con un estado fisiológico normal (Zini *et al.*, 1993).

#### **1.6.5. Producción de ER en espermatozoides**

Inicialmente, se consideraba que sólo determinadas células del sistema inmune eran capaces de producir ROS, pero a partir de 1980, diversos investigadores demostraron que otras células tenían estas capacidades, como las células de las tiroides de mamíferos (Dupuy *et al.*, 1989), células endoteliales de la aorta bovina (Sundqvist, 1991), fibroblastos humanos (Meier *et al.*, 1991), en células del sistema inmune no fagocíticas (Cross y Jones, 1991), etc. También se demostró el papel de segundo mensajero de los ROS en determinadas vías de señalización del páncreas humano (Koshio *et al.*, 1988). En la actualidad se siguen encontrando nuevos tipos celulares que desarrollan ROS como parte normal de la fisiología celular o como residuos del metabolismo celular, entre ellos, los espermatozoides (Costantini, 2014; Guerriero *et al.*, 2014).

En un principio se suponía que los espermatozoides no producían ROS, y que los ER no estaban presentes en el plasma seminal en condiciones fisiológicas (Iwasaki y Gagnon, 1992), atribuyendo su presencia a la participación de células adyacentes como neutrófilos y linfocitos en caso de infección (Plante *et al.*, 1994). Posteriormente se demostró que algunos espermatozoides defectuosos, inmaduros o en condiciones patológicas, eran capaces de generar  $H_2O_2$ ,  $\cdot O_2^-$ ,  $\cdot OH$  y  $\cdot OHCl$  (revisado en Plante *et al.*, 1994; Sharma y Agarwal, 1996; Doshi *et al.*, 2012). Actualmente algunos autores sugieren que los espermatozoides tienen la capacidad de producir ROS en condiciones no patológicas, siendo su origen las mitocondrias (Chen *et al.*, 2003; Koppers *et al.*, 2008, 2010; Murphy, 2009) o el citosol (Brown y Borutaite, 2012): Algunas investigaciones han demostrado el origen mitocondrial de ROS en espermatozoides de rata y conejo (Holland y Storey, 1981; Vernet *et al.*, 2001; Holland *et al.*, 2005), e incluso se ha inducido artificialmente ROS en espermatozoides humanos, mediante el desacople de la cadena transportadora de electrones e inhibidores respiratorios (Aitken *et al.*, 2006; Koppers *et al.*, 2008, 2010). Otras investigaciones consideran que el ROS producido por los espermatozoides procede de una NADPH-oxidasa que se ubicaría en la MP de los espermatozoides (Holland *et al.*, 1982, 2005; Aitken y Clarkson, 1987). Esta oxidasa fue descrita en espermatozoides de conejos, así como en espermatozoides de hombres estériles con defectuosa capacidad de expulsión de los residuos citosólicos (gota citoplasmática) durante la espermatogénesis (Aitken y Clarkson, 1987). Recientes publicaciones confirman la existencia de NADPH-oxidasa asociada a la membrana mitocondrial y plasmática de espermatozoides sanos, y sugieren que es la principal fuente de peróxido de los espermatozoides humanos (Majzoub y Agarwal, 2018).

#### **1.6.6. Papel de ROS en la capacitación y la reacción acrosómica**

Algunos investigadores apuntan que la presencia de pequeñas cantidades de ROS en los espermatozoides de algunos mamíferos, facilitan el proceso de la capacitación (Aitken *et al.*, 1997; Leclerc *et al.*, 1997; O'Flaherty *et al.*, 2006b). Ciertas publicaciones señalan que el óxido nítrico interviene en la regulación de la capacitación y funcionalidad espermática de manera equivalente a ROS (Herrero *et al.*, 2000, 2003; Herrero y Gagnon, 2001; Revelli *et al.*, 2001).

Algunas publicaciones han sugerido que PKC puede activarse por diversos inductores como peróxido de hidrógeno (Revelli *et al.*, 2001; O'Flaherty *et al.*, 2005). Todo ello se apoya en las evidencias de que el líquido seminal tiene componentes inhibidores de la capacitación, como proteínas de unión a fosfatidilcolina, glicodelina S, semenogelina y zinc, teniendo estos dos últimos efecto AO, así como las evidencias que relacionan SOD con un efecto supresor de la capacitación y el desarrollo de HA (revisado en de Lamirande y O'Flaherty, 2008; de Lamirande *et al.*, 2009; Costantini *et al.*, 2010; de Lamirande y Lamothe, 2010; Costantini, 2014). Debido a la presencia de ROS en el aparato reproductor femenino, junto con componentes inductores de la capacitación como es el calcio, bicarbonato, progesterona y elementos que incrementan el pH intraespermático, se ha sugerido que ROS tiene un papel importante en funcionalidad espermática (Lu *et al.*, 2018). Algunos autores contradicen estas hipótesis al haber demostrado que, al añadir CAT al medio de cultivo, se observan mejoras en ciertos factores de la funcionalidad espermática, como la movilidad, viabilidad y calidad espermática, especialmente en espermatozoides humanos criocongelados (Moubasher *et al.*, 2013), así como en la morfología e integridad del ADN espermático, y el desarrollo de RA en los espermatozoides de diversas especies de mamíferos como toro, caballo, ciervo, ratón y humanos (Chi *et al.*, 2008; Moubasher *et al.*, 2013; Walczak–Jedrzejska *et al.*, 2013; Moghbeli *et al.*, 2016; Mohammadzadeh *et al.*, 2019), sugiriendo que ROS no tiene efecto positivo sobre la funcionalidad espermática.

En base a las publicaciones que están a favor del efecto de ROS como mediadores de la funcionalidad espermática en mamíferos e inductores de la capacitación, los autores sugieren que ROS interviene como segundo mensajero en la señalización celular que regula tanto la movilidad, como a la proporción de espermatozoides que experimentan la capacitación, HA y la RA (revisado en Aitken *et al.*, 1989, 1996, 1997; de Lamirande y Gagnon, 1993a, 1993c; Sharma y Agarwal, 1996). Se ha evidenciado la existencia de un incremento progresivo y sostenido de ROS en los espermatozoides humanos justo después de la eyaculación (Costantini, 2014). Este incremento podría deberse tanto a la producción de ROS propia de los espermatozoides, como por una entrada del ROS existente en el tracto reproductor femenino (Lu *et al.*, 2018). Por ello, estos

autores sugieren que el incremento temprano de ROS es facilitador de la capacitación y de la HA en los espermatozoides de diversas especies de mamíferos como humanos y ciervos (de Lamirande y Gagnon, 1995; Aitken *et al.*, 1997, 1998), por medio de la activación de la AC al inicio de la capacitación, y por la inhibición de las fosfatasa que reprimen la activación espontánea de PKA (Aitken, Paterson, *et al.*, 1995; Aitken *et al.*, 1998, 2015; Baker *et al.*, 2006), causando la activación de PKA durante la capacitación, y de PKC durante la RA (Etkovitz *et al.*, 2007; Breitbart y Etkovitz, 2011).

La modificación de la MP por el ataque oxidativo de ROS podría favorecer la reorganización de la misma, necesaria para el desarrollo de la capacitación y para el reconocimiento y fusión gamética (Aitken *et al.*, 1989; Aitken y Fisher, 1994). Se ha sugerido que el incremento de ROS en el interior celular podría activar a la PLA<sub>2</sub>, mediante la formación de peróxidos lipídicos en la MP. Tal y como se comentó anteriormente, PLA<sub>2</sub> interviene en la regulación de la capacitación, así como en la RA dependiente de calcio, activada tras la formación de DAG. Algunos autores sugieren que la regulación de TRPV1, la fosforilación de proteínas relacionadas con la capacitación (pPKA y pY) y los eventos que conducen a la RA, pueden estar parcialmente mediadas por ROS y fosfolipasa A, al menos en espermatozoides de cerdo (Awda *et al.*, 2009).

Algunos autores sugieren que los espermatozoides son sometidos a un tipo apoptosis celular, la cual estaría regulada por la concentración intracelular de ROS. Para estos autores, la señal dependiente de la concentración de los ROS generaría un balance entre la apoptosis y proceso capacitante, de manera equivalente a la señalización de proliferación – diferenciación - supervivencia o apoptosis mediada por ROS en determinadas células somáticas (Kim *et al.*, 2010; Aitken *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017). Otros autores sugieren que este proceso se da principalmente durante la espermatogénesis o ante determinadas patologías (Ghasemzadeh *et al.*, 2015; Bosakova *et al.*, 2018), por lo que los espermatozoides maduros no experimentarían apoptosis, pero que algunos procesos celulares de la apoptosis serían similares a los de la capacitación, en relación a los mecanismos que se activan (Ricci *et al.*, 2009; Aitken *et al.*, 2015).

### 1.6.7. Efectos negativos de ROS en la integridad y función espermática

Los espermatozoides son células muy susceptibles del DO debido a que su membrana citoplasmática es muy rica en PUFAs (revisado en Koppers *et al.*, 2008; Guerriero *et al.*, 2014), pero también debido a la incapacidad del núcleo espermático de reparar el ADN dañado. Se ha demostrado que el EO es inducido naturalmente en los espermatozoides, tanto por cambios en la composición del líquido seminal, como por las secreciones vaginales (Sharma y Agarwal, 1996). Gracias al sistema AOs, se asegura la homeostasis de los ROS producidos en los espermatozoides (Mohammadzadeh *et al.*, 2019). No obstante, algunas situaciones de estrés pueden ocasionar EO en los espermatozoides, debido al incremento del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intraespermático (Bai y Cederbaum, 2001). Una de las consecuencias del EO, es el ataque oxidativo de lípidos, proteínas y ADN mitocondrial (Moghbeli *et al.*, 2016; Mohammadzadeh *et al.*, 2019), causando la ruptura en la transmisión de energía a los espermatozoides, reduciendo la movilidad y viabilidad de los mismos (O'Flaherty, 2014a, 2014b; Moghbeli *et al.*, 2016). Si se llegara a causar DO sobre el ADN de espermatozoides, se generarían mutaciones por cambio de bases, ruptura del ADN y problemas de unión de la cromatina, que en última instancia ocasionan disminución de la tasa de fertilidad y problemas de gestación y en el embrión (delBarco-Trillo *et al.*, 2016; Gosalvez *et al.*, 2017; Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2019).

Diversos estudios sobre el efecto del incremento de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en espermatozoides, han demostrado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es el mayor causante del DO en espermatozoides (revisado en de Lamirande *et al.*, 1991). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es capaz de difundir libremente a través de las membranas celulares del espermatozoide (Sharma y Agarwal, 1996), y de inhibir algunas enzimas como a la glucosa-6 fosfato-deshidrogenasa (G6PDH), los que implica la disminución de la actividad de NADPH, y por tanto, del reciclado de GSSG en GSH (de Lamirande *et al.*, 1991; Griveau, Dumont, *et al.*, 1995; Sharma y Agarwal, 1996). Algunos autores sugieren que un exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causaría DO por el ataque oxidativo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la MP, generando LPO que altera los componentes de la MP, su organización y fluidez, y por lo tanto, modificando la función de dicha membrana (Guerriero *et al.*, 2014). El DO también causa alteración en el perfil proteico, así como graves daños en el ADN



espermático, tanto a nivel mitocondrial, como nuclear (Jones *et al.*, 1979; Gavella y Lipovac, 1992; R de Vriese. *et al.*, 2003; Aitken *et al.*, 2004, 2014; Lewis y Aitken, 2005; De Iuliis *et al.*, 2009; Doshi *et al.*, 2012). Estas alteraciones ocasionan la pérdida de la enzima de membrana de unión al ATP, modificando la funcionalidad del flagelo, y por lo tanto, la movilidad espermática (Koppers *et al.*, 2010), también reducen la fluidez de la MP, y la capacidad del espermatozoide de reconocer la ZP y de fusionarse con el óvulo (Koppers *et al.*, 2008, 2010; Guerriero *et al.*, 2014).

Existen múltiples evidencias del efecto negativo de ER para la fertilidad masculina: Muchas investigaciones han encontrado relación entre la infertilidad y niveles elevados de ROS en el líquido seminal o en los propios espermatozoides (revisado en Maneesh y Jayalekshmi, 2006). Se han relacionado estados de EO en el aparato reproductor masculino durante la espermiogénesis, con la producción anormal de espermatozoides, o con infertilidad debida a cantidades anormales de espermatozoides defectuosos producidos, presentando daños en la morfología y movilidad (revisado en Sharma y Agarwal, 1996; Doshi *et al.*, 2012).

También se han correlacionado ciertos tipos de infertilidad humana por espermatozoides con elevados niveles de ROS en su interior, con espermatozoides que presentan movilidad alterada o daño en el ADN (Lewis *et al.*, 1994; Koppers *et al.*, 2008, 2010). La mayoría de los autores sostienen que, en humanos infértiles, los espermatozoides pueden mostrar alteraciones que afectan a los niveles intraespermáticos de ROS, los cuales inducen la pérdida de la fertilidad (Sharma y Agarwal, 1996). Principalmente, estas alteraciones son aumentos en los niveles de producción de ROS (Aitken *et al.*, 1991; Sharma y Agarwal, 1996), pero también se han reportado casos relacionados con la disminución de los niveles basales de AOs en el líquido seminal (Alvarez *et al.*, 1987; Lewis *et al.*, 1994).

Otra causa de infertilidad en la que los ROS están implicados es la oligospermia, en las cuales los elevados niveles de ROS producidos por los espermatozoides causan daño “*downstream*” al influjo de calcio que inicia la señalización celular de la última fase de la RA (Aitken y Clarkson, 1987; Lewis *et al.*, 1994). En esta

patología también se ha detectado DO a nivel de LPO de los PUFAs de la MP de los espermatozoides (Lewis *et al.*, 1994; Sharma y Agarwal, 1996).

El varicocele también está asociada a infertilidad y a elevados niveles de ER (ROS y RNS). En esta patología, el incremento de ROS aparece como respuesta ante determinados quimio-atrayentes, que no causan incremento de ROS en humanos sin varicocele (Sharma y Agarwal, 1996).

La leucocitospermia suele deberse a infecciones en el aparato reproductor masculino, y está asociada a infertilidad. Una consecuencia de esta patología es la elevada presencia de ROS y RNS en el líquido seminal, causando elevado estrés oxidativo en torno a los espermatozoides, llegando a producir DO por alteraciones en la membrana plasmática, lo que afecta a la viabilidad, movilidad y al proceso de RA (Tomlinson *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 2006).

El 90% de los hombres con daños en la médula espinal son estériles, debido a que la alta presencia de neutrófilos polinucleados en el eyaculado genera elevados niveles de ROS en los espermatozoides. En esta situación se produce DO en los espermatozoides, provocando las alteraciones de la movilidad que causan infertilidad (Sharma y Agarwal, 1996).



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Nuestra hipótesis de trabajo es que tanto el calcio, como el magnesio y el zinc, así como los ROS, tienen influencia sobre los procesos de viabilidad, movilidad, capacitación, hiperactivación, reacción acrosómica y el desarrollo del perfil proteico propio de la capacitación, en los espermatozoides de ratón.

El objetivo general de la presente tesis doctoral es comprender cómo afectan los elementos de estudio a la funcionalidad espermática del ratón, así como la interrelación entre ellos y la formación de radicales libres en el proceso de la capacitación y movilidad espermática. También se pretende identificar si el magnesio tiene un papel opuesto al calcio en la regulación de la funcionalidad espermática.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1. Examinar el papel de calcio y magnesio en la movilidad, hiperactivación y capacitación espermática.**
- 2. Evaluar el efecto de diversas fuentes de calcio ( $\text{CaCl}_2$  o  $\text{CaCO}_3$ ) en la funcionalidad espermática.**
- 3. Analizar el papel de zinc en la movilidad, hiperactivación y capacitación espermática, así como en la formación de agrupaciones espermáticas.**
- 4. Examinar si el ROS es inductor de la capacitación, y su efecto sobre la movilidad espermática e hiperactivación, así como valorar si los antioxidantes tienen capacidad inhibitoria del proceso capacitante.**
- 5. Determinar si los espermatozoides de ratón pueden generar ROS en condiciones fisiológicas.**
- 6. Analizar si los diversos procesos de la movilidad espermática o de la capacitación e hiperactivación causan variaciones en los niveles intracelulares de ROS, y su relación con calcio, magnesio y zinc.**

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

---

#### 3.1. Animales

Se utilizaron ratones CD-1 machos adquiridos al animalario del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC, Madrid) con menos de 4 meses de edad. Estos animales fueron mantenidos en el animalario del MNCN-CSIC hasta el momento de uso (entre los 4 y 6 meses de edad). La manipulación y sacrificio de estos animales fueron llevados a cabo según la normativa española, que se recoge en el RD53/2013, siguiendo las directrices de la regulación 2010/63 de la Unión Europea. No se realizó experimentación sobre estos animales.

Para los estudios realizados en la Universidad de Massachusetts-Amherst, los ratones CD-1 machos fueron comprados a *Charles River Laboratories* (Wilmington, Massachusetts) y posteriormente criados y mantenidos por el animalario del Departamento de Veterinaria y Ciencias Animales de la Universidad de Massachusetts (Amherst, Massachusetts). Todos los procedimientos realizados con dichos animales fueron aprobados por el Comité de Ética del Estado de Massachusetts (*Animal Care and Use Committee*), y siguiendo la normativa de la UMass-Amherst. No se realizó experimentación sobre estos animales.

En ambos animalarios, los animales se estabularon de manera individual, a 22°C, con disposición de comida y bebida *ad libitum* y un fotoperíodo de 12 h luz y 12 h de oscuridad.

Para examinar si los datos generados entre ambos laboratorios fueron similares, se compararon los resultados de los controles obtenidos en la Universidad de Massachusetts (2014 y 2016), con los obtenidos en MNCN-CSIC (2015-2017), utilizando análisis de cinética espermática (velocidad y trayectoria), y patrones de fosforilación de proteínas. Los resultados fueron comparables y consistentes entre ambos laboratorios.

### 3.2. Obtención e incubación de espermatozoides

#### 3.2.1. Medios de cultivo

El medio de incubación empleado fue una modificación del medio TYH (Toyoda, Yokoyama y Hosi) que es una variación del medio Krebs-Ringer (Toyoda *et al.*, 1971; Toyoda y Yokoyama, 2016). Se empleó la versión de Lee y Storey (1985), en la que se incluye HEPES en el medio TYH. Esta adaptación del medio TYH contiene los siguientes componentes (todos adquiridos a Sigma-Aldrich): NaCl (Ref. S5886), 119.3 mM; KCl (Ref. P5405), 4.7 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Ref. P5655), 1.2 mM; CaCl<sub>2</sub> (Ref. C5670), 1.71 mM; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Ref. M5921), 1.2 mM; HEPES (Ref. H4034), 20 mM; glucosa (Ref. G6152), 5.56 mM; gentamicina (Ref. G1272), 10 µg/mL; piruvato sódico (Ref. P4562), 0.8 µM; rojo de fenol (Ref. P3532), al 1%; albúmina de suero bovino (BSA; *Bovine Serum Albumin*) (Ref. 05470), 10 mg/mL y NaHCO<sub>3</sub> (Ref. S5761), 15 mM (Lee y Storey, 1985). En estas condiciones, el medio es denominado “*medio capacitante*” (CAP) pues imita a la composición de los fluidos del oviducto de ratones, permitiendo la supervivencia y la capacitación (Lee y Storey, 1985).

También se empleó una variación del medio TYH, sin BSA ni NaHCO<sub>3</sub>, que permite la supervivencia de los espermatozoides, pero no su capacitación (Visconti *et al.*, 1999). Por esta razón, denominamos a esta versión del medio TYH como “*medio de supervivencia*” o “*medio no capacitante*” (NC). El medio NC permite tanto la recolección de espermatozoides desde el epidídimo antes del desarrollo de la capacitación, como evaluar el efecto de las distintas condiciones experimentales a los espermatozoides en un estado basal. El medio CAP permite evaluar cómo afectan las condiciones experimentales a los espermatozoides durante la capacitación (Visconti *et al.*, 1999). Ambos medios son utilizados a 37°C, en una atmósfera de aire, y con pH entre 7.2-7.4.

A diferencia del medio Tyrode-modificado (mT-H), cuya versión capacitante con bicarbonato sódico (mT-BH) se emplea en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>/aire (Fraser, 1983; Shi y Roldan, 1995), el medio TYH usado se utiliza al aire (con escaso contenido de CO<sub>2</sub>) tanto en NC como en CAP, para poder incubar a los espermatozoides en presencia de bicarbonato sódico (condiciones

capacitantes), pero sin que éste contribuya al control del pH en combinación con CO<sub>2</sub> (Navarrete *et al.*, 2015).

El medio NC se utiliza para la recolección de espermatozoides por *swim-out* (ver apartado 3.2.2), y para la incubación de los espermatozoides en condiciones de supervivencia, mientras que CAP se utiliza únicamente para incubar a los espermatozoides en condiciones capacitantes.

El medio TYH se prepara mezclando todos los componentes, a excepción de la albúmina, el bicarbonato y el piruvato sódicos, en 500 mL de agua destilada. El medio se conserva en nevera a 4°C hasta el momento de su uso, momento en el que se añade 1 µL/mL de solución piruvato sódico, a partir de un stock de 800 mM (15 mg en 170 µL de TYH). Este medio se identifica como TYH-NC (NC). Para preparar el medio CAP, se añade al medio TYH-NC el bicarbonato sódico y la BSA. Posteriormente, se ajusta el pH de ambos medios, y se alícuota en los viales correspondientes. Antes de su uso, los medios se calientan a 37°C.

En los experimentos donde se evaluó la presencia/ausencia de calcio o magnesio en la funcionalidad espermática, el medio TYH se modificó para excluir el catión de estudio. En las muestras donde el calcio o el magnesio debían estar presentes durante la incubación, el catión correspondiente se añadió en el medio NC con el que se haría la dilución final de la suspensión espermática, de manera que su concentración final fuera 1.71 mM de calcio o 1.2 mM de magnesio. En estos ensayos, el *swim-out* se realizó en ausencia de los cationes, estableciéndose las condiciones experimentales en el tiempo 0. En los casos en los que se eliminó una sal de la composición original (CaCl<sub>2</sub> o MgSO<sub>4</sub>), se realizó un ajuste de la concentración de NaCl, para mantener la osmolaridad en el medio, por lo tanto, se emplearon 121 mM o 120 mM de NaCl, en vez de los 119.3 mM utilizados habitualmente. Así mismo, el quelante de calcio y de magnesio “N,N,N',N' Ácido tetra-acéticoetilenglicol-bis(2-aminoetileter)” (EGTA), (Ref. E0396, Sigma-Aldrich), así como el quelante de zinc “N,N,N',N'-Tetrakis(2-piridilmetil)etilendiamina” (TPEN) (Ref. P4413, Sigma-Aldrich), también fueron añadidos al medio de cultivo con el que se realizó la dilución final de la suspensión espermática, justo antes de la incorporación de los espermatozoides,

de modo que en las condiciones finales, la suspensión espermática quede a la concentración adecuada.

En los experimentos donde se evaluó el efecto de radicales libres de oxígeno o antioxidantes en la funcionalidad espermática, el medio TYH fue preparado sin rojo de fenol, al ser éste un antioxidante (Roy y Atreja, 2008b). El rojo fenol tampoco se utilizó en los experimentos con citometría de flujo, al interferir en la señal lumínica de los receptores del citómetro.

### **3.2.2. Sacrificio de animales y extracción de espermatozoides**

Las distintas series experimentales fueron realizadas con un conjunto de ratones, sin embargo, cada experimento fue realizado sobre un ratón cada vez, y por ello la variable “sujeto” fue considerada como aleatoria en el análisis estadístico. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical previamente a la extracción de los epidídimos. Los espermatozoides se obtuvieron mediante *swim-out*; para ello, se aisló la región caudal de cada epidídimo y posteriormente se le realizaron de tres a cinco incisiones, antes de ser sumergidas durante 5-10 min en 500 µL de medio NC por epidídimo, a 37°C. De esta manera, los espermatozoides son capaces de nadar libremente desde el epidídimo hacia el medio. Al final del *swim-out*, el tejido epididimario fue descartado, y la suspensión espermática transferida a un tubo Eppendorf de 1.5 mL. La suspensión espermática fue lavada mediante 5 min de centrifugación a 200 x g. Tras la centrifugación, se descartó el sobrenadante de cada uno de los tubos y se añadieron 500 µL de NC, generándose la suspensión espermática final.

El lavado de la muestra espermática no se emplea habitualmente en la preparación de los espermatozoides, pero es un procedimiento necesario durante la experimentación de la presente tesis por los siguientes motivos:

- 1) Concentra la suspensión espermática a la solución de trabajo necesaria (Domínguez-Rebolledo *et al.*, 2009; Ricci *et al.*, 2009).
- 2) Permite la eliminación de residuos epididimarios y de los espermatozoides dañados, necesario en los experimentos de citometría y evaluación de la movilidad espermática;



- 3) Facilita la eliminación de calcio, magnesio o zinc residual procedente del epidídimo, necesario en los experimentos donde se evalúan los efectos de cada catión;

Estos lavados, no obstante, no eliminan completamente los cationes de los espermatozoides, y por ello se considera que, en estas condiciones, las muestras son “deficientes” pero no libres de dichos cationes. Por ello, se incluyó la centrifugación de las muestras después del *swim-out* como un proceso rutinario, de manera que se pudiera homogeneizar el procedimiento de trabajo y tener unos resultados comparables entre las diferentes series experimentales.

En el apartado 3.9, se presentan los resultados de un estudio comparativo entre la funcionalidad de los espermatozoides según si fueron centrifugados o no, para determinar el efecto de la centrifugación en nuestros resultados.

### **3.2.3. Estimación de concentración espermática, dilución de espermatozoides e incubación**

La concentración de trabajo necesaria es de  $1-2 \times 10^6$  espermatozoides/mL para los experimentos de citometría de flujo, y de  $3-5 \times 10^6$  espermatozoides/mL para el resto de los ensayos. Para ajustar la concentración de espermatozoides de las muestras, se evaluó su concentración en la suspensión espermática obtenida después del *swim-out*. Para ello se utilizó una cámara de recuento de Neubauer (Ref.: 10490171, Fisher-Scientific) y la solución de recuento espermático “*Sperm Counting Medium*” (SCM). El SCM está compuesto por EGTA (Ref. 10093, BDH) 2 mM, NaCl (Ref. S5886, Sigma-Aldrich) 9%; Formaldehído (Ref. 211328, Panreac), 0.1% y Polietilenglicol (Ref. P2263, Sigma-Aldrich), 0.1%.

Primero se fijaron 10  $\mu$ L de la suspensión espermática con 90  $\mu$ L de SCM y, posteriormente, se diluyeron 20  $\mu$ L de la solución fijada en 80  $\mu$ L de SCM. Finalmente, se cargaron 10  $\mu$ L de esta dilución en la cámara Neubauer, y se contaron los espermatozoides presentes en 4 cuadrados de la cuadrícula grande exterior. Únicamente se contaron los espermatozoides en los que la cabeza y el flagelo permanecían unidos.

Una vez estimada la concentración de la suspensión espermática, se realizó una primera dilución de la suspensión, para llevar a los espermatozoides a una concentración 4x de la concentración de trabajo. Esta dilución se realizó en medio TYH-NC, sin iones en los experimentos que evalúan los efectos de calcio o magnesio. Posteriormente, se realizó una dilución 1/3 de la suspensión espermática en 2/3 de NC, para incubar a los espermatozoides en medio NC, o dilución 1/4 de la suspensión espermática en 1/4 de NC más 2/4 de CAP, para incubar los espermatozoides en medio CAP. En ambos casos, el medio NC o CAP en el que se realiza la dilución final, contiene las condiciones experimentales necesarias (concentraciones de cationes, presencia de CAT, SOD o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, EGTA, TPEN), de manera que se obtuvieran las muestras espermáticas a la concentración de trabajo deseada. Se consideró como *tiempo experimental cero*, al momento que se realizó esta última dilución y los espermatozoides quedaron en las condiciones experimentales y concentraciones necesarias.

### **3.3. Incubaciones y muestras**

En todos los experimentos, la incubación de los espermatozoides se realizó a 37°C, en oscuridad, durante un período de entre 60 y 90 min. A lo largo de la incubación, se tomaron alícuotas de las muestras cada 15 min para su análisis correspondiente. Las únicas variaciones entre experimentos fue la presencia o ausencia de cationes (calcio, magnesio o zinc), quelantes (EGTA, TPEN), CAT o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las distintas condiciones experimentales se especifican en los capítulos de resultados correspondientes.

Un esquema general de todo el proceso de extracción espermática, obtención de la muestra y su análisis se encuentra en la **figura 3.1**.

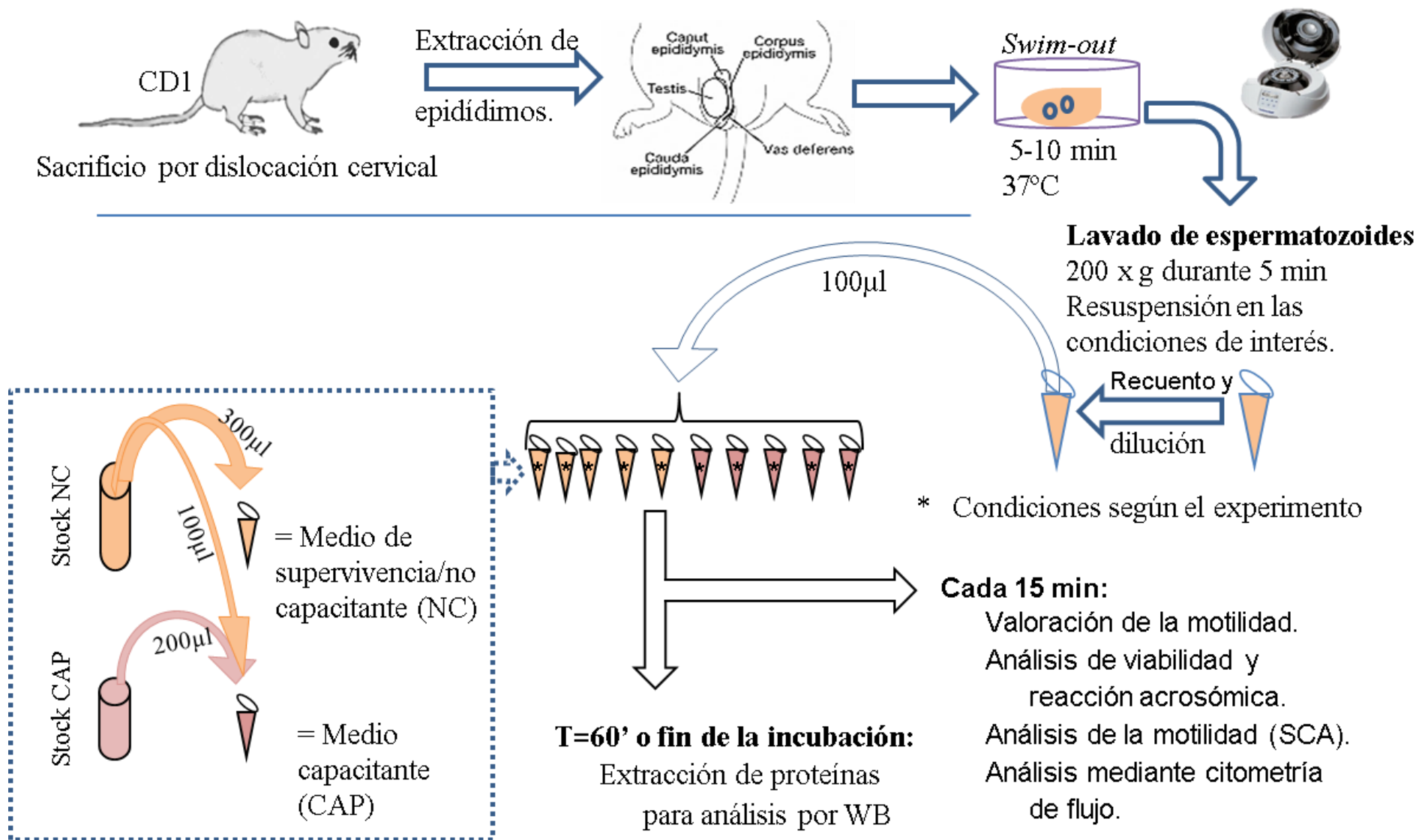


Figura 3.1. Metodología empleada para la preparación y análisis de los espermatozoides.

### **3.4. Análisis de viabilidad espermática e integridad del acrosoma**

#### **3.4.1. Preparación de las muestras y tinción.**

Para estimar el porcentaje de espermatozoides vivos de cada muestra, se emplearon frotis de suspensión espermática teñidos con eosina-nigrosina y Giemsa (Gómez Montoto *et al.*, 2011). Para ello, cada 15 min se tomó una alícuota de cada muestra para realizar el frotis, mezclando la suspensión espermática con solución eosina-nigrosina en proporción 1:3 (Cassinello *et al.*, 1998; Pintado *et al.*, 2000). Para estimar el porcentaje de espermatozoides vivos con el acrosoma intacto, los frotis realizados se fijaron con formaldehído al 4% durante 5 min, y posteriormente se tiñeron con Giemsa (Watson, 1975).

La solución de nigrosina-eosina está preparada por 0.7 g de eosina Y-hidrosoluble (Ref. E6003, Sigma-Aldrich), 10 g de nigrosina (Ref. N4754, Sigma-Aldrich), 7.5 mL de D-Glucosa (Ref. G6152, Sigma-Aldrich) 50 mM y 100 mL de buffer tartrato, fosfato, glucosa (TPB). El buffer TBP, está formado por Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro (Ref. 102494C, BDH), 50 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Ref. P5655 Sigma-Aldrich), 25 mM y K/Na-tartrato-4H<sub>2</sub>O (Ref. 108087, Merck;) 77 mM.

La solución stock de Giemsa está compuesta por 3.8 g de Giemsa (Ref. 109203, Merck) y 375 mL de metanol absoluto (Ref. 106009, Merck). Para realizar la tinción de los frotis previamente fijados con formaldehído 4% en TPB, se utilizan 7.87 mL de la solución stock de Giemsa, previamente diluida en una mezcla de 56.88 mL de agua destilada, con 5.25 mL de buffer TPB.

#### **3.4.2. Valoración de las tinciones**

El estudio de la viabilidad espermática y la comprobación del estatus acrosómico se evaluó a los 0, 15, 30, 45 y 60 min. Para ello se contabilizaron 100 espermatozoides de cada frotis de espermatozoides teñido con eosina-nigrosina-Giemsa, utilizando un microscopio binocular con campo claro Eclipse 50i; (Nikon, Japón) a 40x o 100x.

La tinción con eosina-nigrosina distingue los espermatozoides vivos de los muertos. Así, los espermatozoides no teñidos con eosina se consideran vivos,

mientras que los que se tiñen (tono rosáceo), se categorizan como muertos. Después de realizar la tinción con Giemsa, es posible distinguir tres tipos de espermatozoides según el estado del acrosoma: aquellos con acrosoma intacto, los que tienen el acrosoma dañado, y los que han perdido el acrosoma.

Al teñir primero con eosina-nigrosina y, después, con Giemsa, los espermatozoides muertos retienen el colorante de eosina en la región postacrosomal y, por tanto, se pueden distinguir los vivos, de los muertos, con distinto estado de acrosoma en ambos casos:

A) Espermatozoides vivos con el acrosoma intacto (sin tinción en la región post-acrosómica, y el acrosoma azul).

B) espermatozoides muertos con el acrosoma intacto (con la región post-acrosómica teñida de rosa, y el acrosoma azul).

C) espermatozoides vivos sin acrosoma (espermatozoides sin tinción en la cabeza y sin el acrosoma).

D) espermatozoides muertos sin acrosoma (espermatozoides rosáceos en la región post-acrosómica y sin el acrosoma).

Para la presente tesis doctoral se estimaron el porcentaje de espermatozoides vivos, y el porcentaje de espermatozoides vivos con el acrosoma intacto.

### **3.5. Análisis de movilidad y cinética espermiática**

Para evaluar cómo afectan las diversas condiciones experimentales al movimiento de los espermatozoides se analizaron el número de espermatozoides móviles, el porcentaje de cada clase espermiática y los parámetros de la cinética espermiática, a los 0, 15, 30, 45 y 60 min. Para ello se usaron softwares de análisis asistidos por ordenador "*Computer Aided Sperm Analysis*" (CASA). Estos programas procesan una serie de imágenes capturadas mediante un sistema de video-microscopía y evalúan los parámetros de velocidad y trayectoria de los espermatozoides, a partir de la identificación posicional de la cabeza espermiática, y su progresión a lo largo de secuencia de imágenes (Mortimer, 2000; Yániz *et al.*, 2018). Estos programas son capaces de

identificar a los espermatozoides presentes en el campo y cuantificar diversas variables de velocidad y trayectoria espermáticas de cada uno de ellos, así como clasificarlos en base a dichos parámetros.

### 3.5.1. Captura de imágenes

Para el análisis de movilidad se colocó una muestra de suspensión espermática en una cámara de observación (Leja, Nieuw-Vennep, Países Bajos) de 6  $\mu\text{L}$  de volumen, que se precalentó a 37°C. Las cámaras Leja consisten en un porta- y un cubreobjetos separado por 20  $\mu\text{m}$  de profundidad permitiendo el análisis de las propiedades de la cinética espermática. Para la captura de imágenes en el laboratorio del MNCN-CSIC, se empleó una videocámara (Basler acA1300, *Vision Technologies*, Glen Burnie, MD, USA) acoplada a un microscopio de contraste de fases Eclipse 50i; (Nikon) con el objetivo de 4x, de la manera habitual del grupo de investigación (Gómez Montoto *et al.*, 2011; Tourmente *et al.*, 2015). El software CASA empleado fue el “*Sperm Class Analyzer*” (SCA) v.6.0, (Microptic, Barcelona, España). Para los experimentos realizados en la Universidad de Massachusetts se empleó un microscopio Olympus CX41, acoplado a una cámara CCD-XC-ST50 de Sony, con el programa “CEROS” (*Hamilton Thorne Research*, Beverly, MA). Para el buen funcionamiento de los programas SCA y CEROS, la concentración de la muestra en la alícuota analizada se ajustó a 4–6  $\times 10^6$  células/mL.

Los ajustes del programa SCA se configuraron de la siguiente manera: Tamaño de partícula máximo: 320  $\mu\text{m}$ ; tamaño de partícula mínimo: 50  $\mu\text{m}$ ; conectividad: 20; contraste: 600; y brillo: 60. En el caso del programa CEROS, se configuró para el análisis de espermatozoides de ratón del propio programa; es decir: 90 *frames* adquiridos; 60 Hz de velocidad de fotogramas; tamaño mínimo de celda: 90 píxeles; tamaño máximo de celda: 150 píxeles; tamaño de la cabeza estática: 0.13-2.43  $\mu\text{m}^2$ ; intensidad estática de la cabeza: 0.10-1.52; elongación estática de la cabeza: 5-100.

Se registraron un mínimo de 200 trayectorias de espermatozoides en al menos 6 campos tomados de manera aleatoria, por cada muestra y tiempo experimental. Cada campo se registró durante 1 segundo a 25 cuadros por

segundo en el sistema SCA, y 60 *frames* por segundo, durante un segundo y medio en el sistema CEROS.

### 3.5.2. Porcentaje de espermatozoides móviles

Una vez analizadas las muestras, los softwares CASA generan una base de datos con el número de espermatozoides analizados por cada campo. De cada espermatozoide se indican los valores de los parámetros de cinética espermática, datos de su morfología (tamaño, elongación, entre otros), así como la clase espermática a la que pertenecen. De esta manera, se pudo evaluar el porcentaje de espermatozoides móviles del total de los analizados, así como el porcentaje de cada clase de espermatozoides vigorosos.

### 3.5.3. Descriptores de la cinética espermática

Se analizaron los 3 parámetros de la velocidad y los 5 parámetros de la trayectoria del movimiento de los espermatozoides más comúnmente utilizados en este tipo de estudios (Cancel *et al.*, 2000; Goodson *et al.*, 2011; Amann y Waberski, 2014; Yániz *et al.*, 2018), los cuales se describen a continuación y en la **Figura 3.2**:

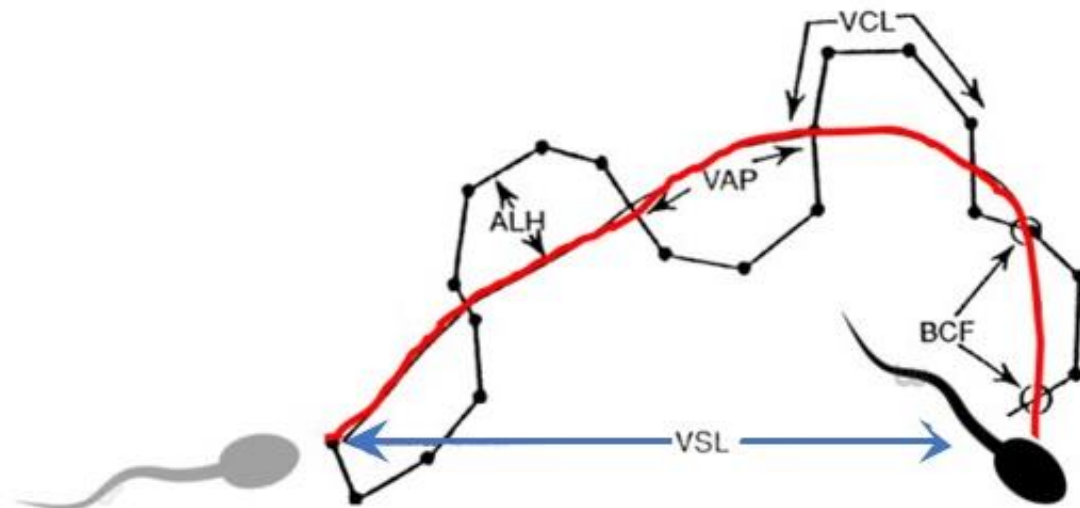
Parámetros de velocidad espermática:

- *Velocidad curvilínea (VCL; curvilinear velocity)*: Distancia total recorrida por el espermatozoide en el tiempo de filmación. Se mide en  $\mu\text{m/s}$ .
- *Velocidad rectilínea (VSL; straight-line velocity)*: Distancia en línea recta entre la primera y la última posición de la cabeza. Se mide en  $\mu\text{m/s}$ .
- *Velocidad de la trayectoria media (VAP; Average path velocity)*: Distancia recorrida por el espermatozoide en el tiempo de filmación, medida como un camino calculado entre 15 puntos equidistantes. Se mide en  $\mu\text{m/s}$ .

Parámetros de la trayectoria espermática:

- *Linealidad (LIN)*. Proporción de la VCL representada por la VSL (VSL/VCL).

- *Rectitud de la trayectoria (STR; Straightness)*. Proporción de la VAP representada por la VSL ( $VSL/VAP$ ).
- *Oscilación del movimiento (WOB; Wobble)*. Proporción de la VCL representada por la VAP ( $VAP/VCL$ ).
- *Desplazamiento lateral de la cabeza (ALH; Amplitude of lateral head displacement)*. Promedio de la distancia entre la trayectoria de VCL y VAP en cada uno de los 15 puntos de VAP. Se mide en  $\mu\text{m}$ .
- *Frecuencia de cruce del batido flagelar (BCF; Beat cross frequency)*. Número de veces en las que VCL cruza la trayectoria de VAP por segundo. Se mide en hertzios (Hz).



**Figura 3.2.** Representación gráfica del movimiento del espermatozoide y los principales parámetros de movilidad espermática obtenida de (Boiti *et al.*, 2005).

VCL: Velocidad curvilínea; VSL: Velocidad rectilínea; VAP: Velocidad promedio; ALH: Desplazamiento lateral de la cabeza; BCF: Frecuencia de cruce del batido flagelar.

En negro: El movimiento del espermatozoide, es decir, la trayectoria real.

En rojo: el recorrido del espermatozoide.

En azul: El desplazamiento neto del espermatozoide.



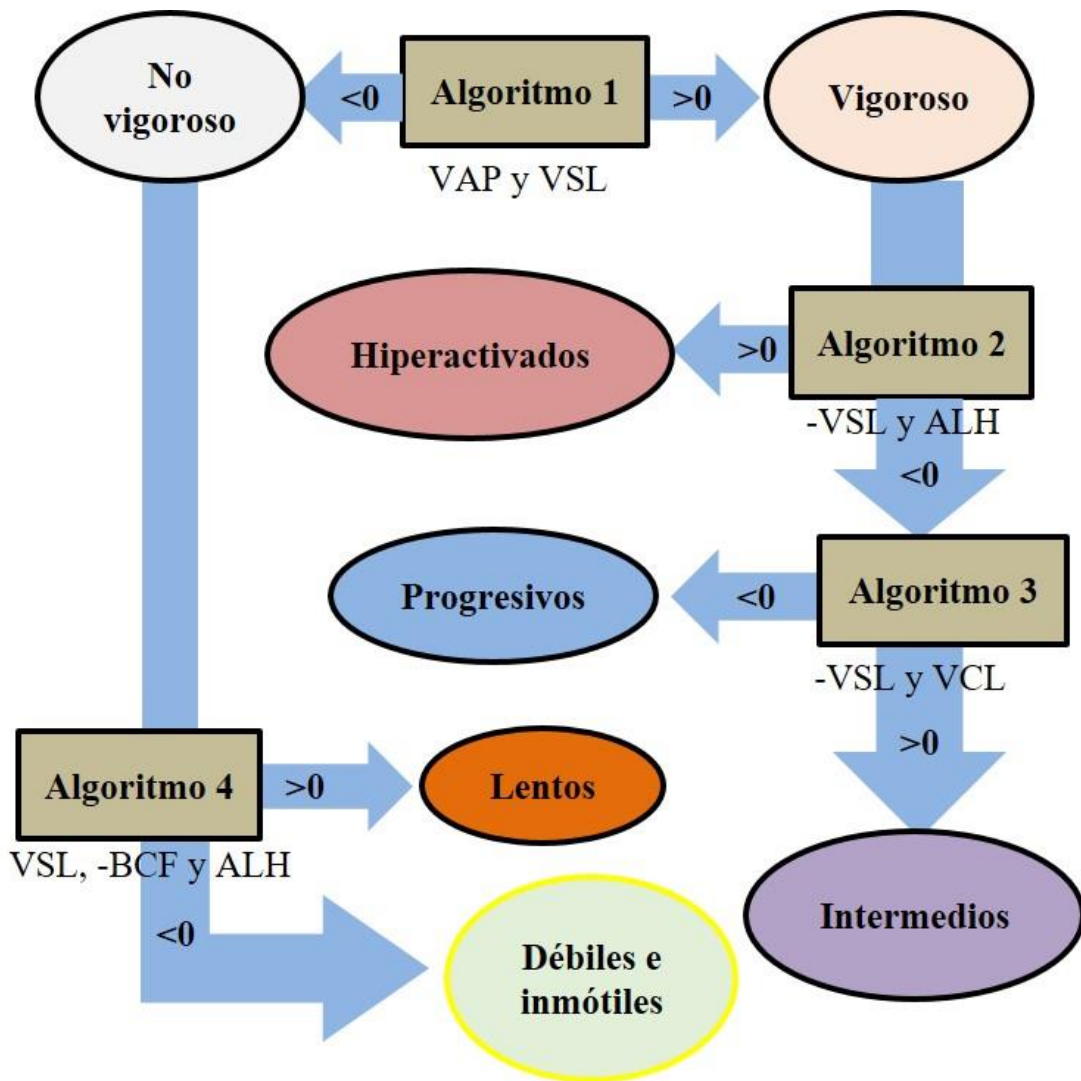
### 3.5.4. Clasificación de los espermatozoides

Tanto el programa SCA como el programa CEROS clasifican a los espermatozoides en base a los parámetros de la cinética espermática, generando un total de 4 clases espermáticas distribuidas en dos categorías: la categoría "**no vigorosos**", que incluye a las clases *inmóvil* y *lentos*; y la categoría "**vigorosos**", que incluye a las clases *progresivos* (activos) e "*intermedios*" (Mortimer, 2000; Goodson *et al.*, 2011).

En la presente tesis, se utilizaron los algoritmos de clasificación descritos por el desarrollador del complemento para el software CEROS, "CASAnova" (Goodson *et al.*, 2011), tanto para el software CEROS como para el software SCA. Los algoritmos CASAnova identifican una subcategoría de espermatozoides "*hiperactivos*" (HA), dentro de la categoría de espermatozoides vigorosos.

Los algoritmos de clasificación de los espermatozoides operan según se ilustra en **la figura 3.3**, y se explican a continuación:

- El primer algoritmo tiene en cuenta VAP y VSL, y clasifica a los espermatozoides entre las categorías de vigoroso y no vigoroso.
- El segundo algoritmo considera ALH y VSL para clasificar a los espermatozoides vigorosos en HA o no hiperactivados.
- El tercer algoritmo clasifica a los espermatozoides vigorosos no hiperactivos en progresivos o intermedios, según VCL y VSL.
- El cuarto algoritmo clasifica a los espermatozoides no vigorosos en lentos o inmóviles, según VCL, ALH y BCF (Goodson *et al.*, 2011).



**Figura 3.3:** Esquema de funcionamiento de los algoritmos CASAnova para identificar espermatozoides hiperactivados. Modificado de Goodson *et al.* (2011).

Los experimentos realizados en la Universidad de Massachusetts se procesaron utilizando el software de análisis CEROS, con el complemento CASAnova, para identificar a los espermatozoides HA. Los experimentos realizados en el laboratorio del MNCN-CSIC, fueron procesados con adaptaciones de los algoritmos CASAnova, adecuándolos a las características del microscopio y cámara del laboratorio del MNCN-CSIC, procediendo como se describe en Goodson *et al.*, (2011). Se compararon los resultados de los controles tanto del medio de supervivencia (NC), como del medio capacitante (CAP) obtenidos entre ambos laboratorios para determinar si los resultados obtenidos en ambos laboratorios eran comparables. Se demostró la semejanza y repetibilidad de ambos grupos de resultados (ver la sección 3.10.).

### 3.6. Análisis de la Capacitación

Para estudiar cómo las distintas condiciones experimentales afectan al proceso de capacitación de los espermatozoides, se analizaron las principales vías de señalización celular de la capacitación (pPKA y pY) (Visconti *et al.*, 1995a; 1995b; 2002; Krapf *et al.*, 2010; Navarrete *et al.*, 2015). Las principales vías de señalización celular que marcan diferencias entre un patrón proteico de espermatozoides capacitados y no capacitados, son las de la ruta AC/PKA, que implica la fosforilación de proteínas sustrato de la proteína quinasa A (pPKA) tras la activación de la AC y formación de AMPc, y la posterior fosforilación de proteínas en los residuos de tirosina (pY) (Visconti *et al.*, 1995a; Visconti *et al.*, 1995b; Arcelay *et al.*, 2008) (ver **figura 1.1**).

Estas vías se analizaron mediante extracción de proteínas, electroforesis SDS-PAGE, y *Western blot* (WB), examinando la fosforilación de los sustratos de PKA (pPKA), y posteriormente, la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina (pY). Para ello, las muestras espermáticas se incubaron a 37°C durante 0, 30, 60 o 90 min, según los requisitos experimentales. Al finalizar la incubación, los espermatozoides se centrifugaron durante 2 min a 200 x g. El *pellet* se lavó con 1 mL de tampón fosfato (PBS) y mediante centrifugación durante 3 min a 200 x g. El PBS está compuesto por NaCl (Ref. S5886), 80 g/L; KCl (Ref. P5405), 2 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Ref. P5655), 2 g/L y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Ref. S3264), 11.5 g/L. Todos estos reactivos se adquirieron a SIGMA.

Los tubos con el *pellet* se colocaron en hielo y posteriormente se añadieron 10 µL de tampón de carga 5x. El tampón de carga está compuesto por Trizma-base (Ref. T6791), 0.5 M (0.583 v/v); Glicerol (Ref. G5516), 0.25 v/v; Sodio-Dodecil-Sulfato (SDS) (Ref. L3771), 0.0833 g/L y azul de bromofenol (Ref. 1.08122) 0.1 g/L. Todos estos reactivos fueron adquiridos a SIGMA. Subsiguientemente, la muestra fue hervida durante 4 min a 100°C y centrifugada durante 5 min a 200 x g. Finalmente el sobrenadante se transfirió a un nuevo vial con 1 µL de β-mercaptoetanol (BME, Ref. A4338.0100 AppliChem/Panreac).

Las proteínas del extracto celular fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, en gel de acrilamida/biscacrilamida al 8%, empleando: 30%

Acrilamida/Bis-acrilamida (Ref. 161-0158, Bio-Rad), el sistema TetraPack de Bio-Rad (Ref. 1658000EDU), cristales de electroforesis *Mini-protean 3* 1.5 mm (Ref. 165-3342, Bio-Rad), peines de 10/15 pocillos (Ref. 165-3365, Bio-Rad), y el patrón de pesos moleculares "*Precision Plus Protein Standards Dual Color*" (Ref. 161-0374, Bio-Rad).

Tras la electroforesis, se realizó la electrotransferencia de las proteínas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) "*Immobilon-P Transfer membrane. Ø 0.45 µm*" (Ref. IPVH00010, Merck), para realizar la inmunodetección primero de sustratos de PKA, y posteriormente de pY.

Los anticuerpos empleados para la detección de pPKA fueron los siguientes (ver **tabla 3.1** para su preparación):

Anticuerpo primario: *Rabbit monoclonal anti-phosphoPKA substrates RRXS\*/T\** (*anti-pPKAs; clone 100G7E*) (Ref. 9624, Cell Signalling (Danvers, MA)).

Anticuerpo secundario: *Amersham ECL Rabbit IgG, Horseradish peroxidase-conjugated whole Ab (from donkey)*. (Ref. NA934VS, Amersham).

Los WB se revelaron empleando el reactivo *WesternSure™ PREMIUM Chemiluminescent Substrate* de 10 mL (Ref. 926-95000, Bonsai Advanced Li-Cor BioSciences), y las membranas se escanearon mediante el procesador de imágenes *C-Digit* (Li-Cor BioSciences; Nebraska, USA).

A continuación, las membranas se lavaron mediante un tampón de *stripping* a 60°C para eliminar la presencia de anticuerpos en la misma. Este compuesto está compuesto por 3.78 g de Tris-HCl, 10 g de SDS, 450 mL de agua destilada (ajustado a pH a 6.5). Antes de su uso, se añaden 15 mL de BME por cada 111 mL del tampón de *stripping*.

Tras el proceso de lavado de la membrana, se realizó una segunda inmunodetección para detectar las proteínas pY. Los anticuerpos empleados para la detección de pY fueron (ver **tabla 3.1** para su preparación):

Anticuerpo primario: *Mouse anti-phosphotyrosin antibody (clone 4G10)* (Ref. 05-321, Millipore).

Anticuerpo secundario: *Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)* (Ref. 715-035-150, Jackson Immuno Research).

Como el WB es una técnica semicualitativa, que permite evaluar si se han dado o no las fosforilaciones oportunas, las imágenes fueron procesadas mediante el software de análisis *Image Studio Lite*™ V.5.2 (Li-Cor BioSciences; Nebraska, USA) para realizar la densitometría del WB, estimando la cantidad de proteínas pPKA y pY fosforiladas. Para evaluar cuantitativamente los patrones de fosforilación, se tomó de referencia la hexoquinasa, cuyo patrón de fosforilación no varía durante la capacitación. Posteriormente, se comparó la “intensidad relativa de la señal” del control capacitante (considerada como el 100% de señal) con el porcentaje de señal relativa de cada *tratamiento*.

**Tabla 3.1** Preparación de anticuerpos para WB

Test	Anticuerpo Primario	Preparación	Anticuerpo Secundario	Preparación
pPKA	<i>Rabbit α-pPKA substrate</i>	Mantener alícuotas a -20°C. Usar 1:1000 en tampón tris con Tween-20 al 0.01% + 5 % BSA.	<i>Donkey α-Rabbit</i>	Resuspender el vial en 0.5 mL de agua, alícuotar almacenar a -20°C. Usar 1:10000 en tampón tris con Tween-20 al 0.01% + 5% leche desnatada.
pY	<i>Mouse α-pY, clon 4G10</i>	Centrifugar antes de usar sobrenadante. Usar 1:10000 en PBS-t 0.01% + 5 % BSA	<i>Peroxidase AffiniPure Donkey α-Mouse IgG (H+L)</i>	Usar 1:10000 en PBS-t 0.01% + 5 % BSA

### 3.7. Análisis citométricos

Con el objetivo de cuantificar la concentración intracelular de especies reactivas de oxígeno ([ROS]<sub>i</sub>) en los espermatozoides de ratón, y de distinguir los resultados entre espermatozoides vivos y muertos, se utilizaron métodos de citometría de flujo. Se empleó el citómetro “Cube 8” (Partec-Sysmex, Japón), que permite usar varios láseres de excitación y receptores de señales en paralelo, reduciendo la señal de fondo de cada foto-excitador.

Para cuantificar [ROS]<sub>i</sub>, se utilizó el fluoróforo 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) (Ref. D399, ThermoFisher Scientific, Madrid). El H<sub>2</sub>DCFDA es una

forma de fluoresceína reducida químicamente y no fluorescente, que difunde libremente en las células y, tras la disociación de los grupos de acetato por parte de las esterasas intracelulares, puede ser oxidado por los ROS intracelulares. Una vez oxidado, el H<sub>2</sub>DCFDA (no fluorescente) se convierte en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), que es altamente fluorescente, emitiendo a  $\lambda_{em}= 492-495$  nm cuando es excitado por el láser azul ( $\lambda_{ex}= 517-527$  nm). En el anexo 1 se indican las regiones analizadas en los experimentos.

Se preparó un control positivo para ambos medios (NC y CAP), conteniendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma; Ref. 516813), de manera que se pudiera verificar que la sonda H<sub>2</sub>DCFDA funcionaba correctamente y que sus medidas eran reconocidas por el citómetro. Esta suspensión espermática se incubó durante 5 min antes de añadirle la sonda de viabilidad y ser analizada mediante el citómetro de flujo.

Para determinar la viabilidad de los espermatozoides se incluyó una sonda que permite identificar células muertas. Esta sonda fue el fluoróforo SYTOX™ *Red Dead Cell Stain*, (Ref. S34859, ThermoFisher Scientific, Madrid), que es un marcador de alta afinidad por ácidos nucleicos, el cual penetra con facilidad en las células con membranas plasmáticas dañadas, pero que no es capaz de marcar ADN en las células intactas. Una vez marcado con esta sonda, el ADN de las células muertas presenta fluorescencia de color rojo brillante, emitiendo a  $\lambda_{em}= 640$  nm, con un solapamiento espectral mínimo, cuando se excita con el láser rojo del citómetro ( $\lambda_{ex}= 633-650$  nm).

Las condiciones experimentales para la citometría de flujo requieren algunas desviaciones respecto al procedimiento habitual:

- El medio de cultivo TYH debe ser preparado sin rojo fenol, ya que este colorante puede generar interferencias con el receptor de señal del láser rojo.
- La suspensión espermática se debe mantener en torno a los  $6 \cdot 10^6$  células/mL durante toda la incubación con las condiciones experimentales adecuadas. Inmediatamente antes del análisis citométrico, se debe diluir una alícuota de cada muestra 1/3 en el medio correspondiente, generando una muestra con  $1.5 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

Tras la obtención y primera dilución de los espermatozoides, se añadió a cada muestra la sonda de detección del [ROS]i (H<sub>2</sub>DCFDA), y cada vial se mantuvo a 37°C y en oscuridad. Para el marcaje de viabilidad espermática, 10 min antes del análisis citométrico, se tomó una alícuota de 750 µL de cada muestra, para obtener 3 mL de suspensión espermática con  $1.5 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Una vez realizada esta dilución, se procedió a incubar la muestra durante 5 min con la sonda de viabilidad (SytoxRed), de manera que se pudieran analizar 3 mL de suspensión espermática marcada con ambas sondas. Se consideraron 3 tiempos experimentales (0, 30 y 60 min), en los que se analizó la viabilidad de los espermatozoides y la [ROS]i, mediante citometría de flujo.

Para el procesado de los resultados citométricos se utilizó el software de análisis FCS Express 4 (DeNovo Software, Indiana, US).

Dado que la preparación de las muestras para citometría de flujo consume la totalidad de las muestras, no se pudo determinar el perfil proteico (SDS-PAGE) de los espermatozoides para valorar el estado de capacitación en dichas muestras. Como se considera que las características experimentales fueron similares a las empleadas para el resto de los ensayos (equivalente a los primeros bloques de resultados), se considera que los espermatozoides respondieron de igual forma en las distintas muestras. No obstante, se realizaron observaciones microscópicas de los espermatozoides cada 15 min para determinar que las muestras respondieron de manera similar al resto de los experimentos realizados, incluyendo la adquisición del estado HA.

En el anexo 1 se explica las regiones utilizadas para cada medida.

### **3.8. Análisis estadístico**

Se realizó el análisis estadístico de todos los resultados obtenidos, para evaluar si las distintas variables se veían afectadas por el tiempo de incubación, el medio de cultivo (de supervivencia o capacitante) o los diversos factores de estudio (*tratamientos*): presencia o ausencia de calcio, magnesio, zinc, ROS, EGTA, TPEN o CAT. Para dichos análisis se utilizaron los programas InfoStat 2018p (Universidad Nacional de Córdoba, AR) y SPSS (V25) (IBM Corp. *Released* 2017. *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0*. Armonk, NY: IBM Corp.).

Se expresaron todos los resultados como promedios de la variable junto con su error estándar (SEM, de las siglas en inglés *standard error of the mean*).

Los valores promedio de las variables de estudio se compararon según el medio de cultivo, tratamiento y tiempo experimental. Además, cuando fue posible, los resultados fueron tratados por separado según la clase espermática. Todas estas variables fueron primeramente analizadas para verificar su normalidad y homocedasticidad, y transformadas según el siguiente criterio: si las variables mostraban una proporción (por ejemplo, porcentajes de células vivas, intensidad relativa de una señal o variables de trayectoria como linealidad, porcentaje de rectitud o de oscilación), entonces se aplicó la transformación del arcoseno de la raíz cuadrada de dicha proporción. Para el resto de las variables, se transformó aplicando el logaritmo en base 10 de la variable. Posteriormente se analizaron todas las variables transformadas mediante un modelo estadístico ajustado a un modelo lineal general mixto (MLGM). Las variables aleatorias fueron el ratón (sujeto) y la muestra (alícuota), siendo las variables fijas el tiempo, medio y tratamiento. Cuando fue necesario, se realizaron análisis *post-hoc* siguiendo los modelos Di Rienzo, Guzmán y Casanoves y T-Tukey B. En el anexo 2 se encuentra la sintaxis usada en el programa SPSS para realizar dichos análisis.

Todo el estudio estadístico permitió detectar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las muestras. Por eso, la mayoría de los resultados serán mostrados en gráficas como promedio  $\pm$  error estándar, siendo éstos calculados por los programas estadísticos utilizados. Se representará mediante asteriscos las muestras con diferencias significativas respecto al control correspondiente. Además, las muestras se clasificarán en niveles de significación, según los análisis estadísticos realizados. Estos grupos serán indicados mediante letras. De este modo, las muestras indicadas por "a", fueron significativamente iguales entre ellas ( $p > 0.05$ ), y tendrán los valores significativamente más bajos de la variable de estudio. Las muestras "b", serán significativamente iguales entre ellas ( $p > 0.05$ ), y significativamente superiores ( $p < 0.05$ ) a las del grupo "a", e inferiores a las del grupo "c". Las muestras con dos letras, no presentaron diferencias significativas con las aquellas de ninguno de los grupos.



En el anexo 3 se encuentran tablas resumen con los valores numéricos de las gráficas y los niveles de significación.

### 3.8.1. Análisis de Componentes Principales (PCA)

Los parámetros de movilidad espermática tienden a estar fuertemente correlacionados (Gómez Montoto *et al.*, 2011). Debido a la complejidad del procesamiento de los datos de los parámetros de cinética espermática, se realizaron análisis de componentes principales (PCA) sobre dichos parámetros. Los PCA permiten integrar la información de los 8 parámetros en variables que resumen la información de la velocidad y de la forma de la trayectoria. Se realizaron PCA independientes (es decir, uno por cada bloque de resultados) de los parámetros de velocidad (VAP, VSL y VCL) y de trayectoria (STR, LIN, WOB, ALH y BCF). Por ello, en cada bloque experimental se generaron dos componentes principales (CP) de la velocidad (OSV1 y OSV2; *Overall Sperm Velocity*), y dos de la forma de la trayectoria (OST 1 y OST2; *Overall Sperm Trajectory*).

Como parte del PCA, se estudió la correlación entre variables, la importancia relativa de cada variable a la definición de los CP, y se determinó la eficiencia de cada CP para predecir las variaciones de los distintos resultados. Estos resultados fueron presentados en sus tablas correspondientes. Posteriormente, los valores de los CP fueron analizados como el resto de las variables de la tesis, mediante un MLGM seguido de las pruebas T-Tukey y T-Tukey B.

En cada bloque de resultados se describe el análisis de PCA y la interpretación de cada variable. Dado que el segundo componente de la velocidad (OSV2) explica menos del 10% de la variabilidad de los datos, en todos los experimentos realizados, se determina que OSV1 es el componente que explica la velocidad espermática, sin describirse OSV2. Los componentes de la trayectoria espermática (OST1 y OST2) serán definidos en cada capítulo.

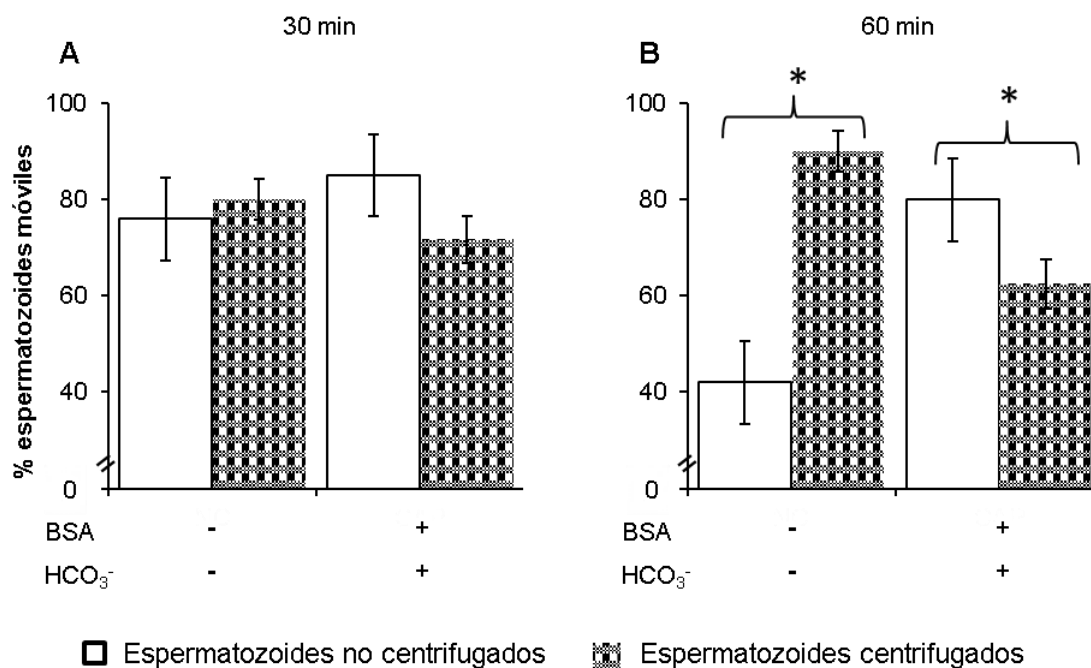
Debido a que se requieren procesos de centrifugación, y a que parte de la experimentación es realizada en laboratorios distintos, se realizaron las pruebas necesarias para determinar el efecto de la centrifugación sobre la funcionalidad espermática, así como para determinar la robustez de la metodología empleada. Esta comparativa se describe en los apartados 3.9 y 3.10, a continuación.

### 3.9. Efecto de la centrifugación sobre la funcionalidad espermática

Durante el desarrollo de la presente tesis doctoral, se realizaron centrifugaciones de 5 min a 200 x g sobre la suspensión espermática resultante del proceso de *swim-out*, para eliminar el calcio, magnesio y otros residuos epididimarios de las muestras, así como para concentrar la suspensión espermática en las condiciones necesarias de trabajo. Estas centrifugaciones se ejecutaron siguiendo las pautas de otros grupos que trabajan líneas de investigación similares (Visconti *et al.*, 2011; Navarrete *et al.*, 2015).

La centrifugación puede tener un efecto negativo sobre la funcionalidad espermática. Para determinar su efecto sobre los distintos parámetros de estudio de la presente tesis doctoral, se realizó una investigación previa comparando las variables de estudio entre muestras centrifugadas y no centrifugadas antes de la incubación en cada medio. Estas muestras fueron equivalentes a los controles empleados, de manera que se obtuvo un control de supervivencia (NC<sub>cc</sub>), control capacitado (CAP<sub>c</sub>), control de supervivencia centrifugado (NC<sub>cc</sub>) y control capacitado centrifugado (CAP<sub>cc</sub>). Se emplearon un total de 5 ratones CD-1 macho, de entre 4-6 meses de edad, extrayendo los espermatozoides como se indicó en la metodología general. Tras el proceso de *swim-out* realizado en 1 mL de NC, se descartó el epidídimo, y 500 µL de la suspensión espermática fue centrifugada durante 5 min a 200 x g. Después del proceso de lavado, los espermatozoides fueron resuspendidos en el medio de supervivencia, o en el medio de capacitación (CAP) (TYH-CAP). Los 500 µL de la suspensión espermática no centrifugada también se diluyeron en medio NC o CAP, generando así los dos controles no centrifugados. Se analizaron todos los parámetros de estudio de la presente tesis doctoral, a excepción de [ROS]<sub>i</sub>, mediante las técnicas explicadas en la metodología general.

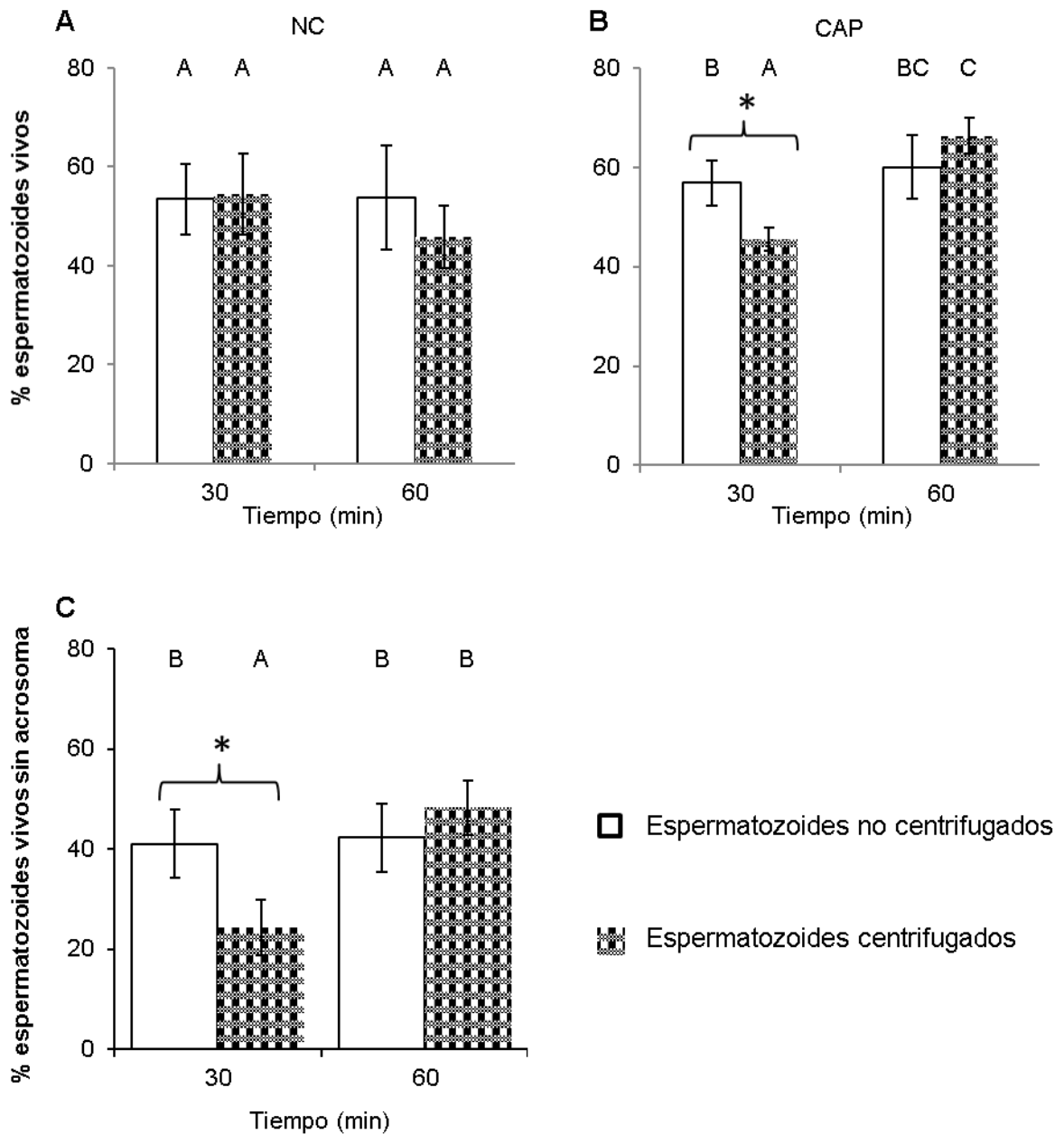
No se registraron diferencias en el porcentaje de espermatozoides móviles en ninguno de los medios a los 30 min de incubación, debidas a la centrifugación (**Fig. 3.4 A**), sin embargo, al final de ésta, el porcentaje de células móviles aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) en las muestras centrifugadas del medio NC respecto a su control (**Fig. 3.4 B**), con un efecto contrario en condiciones capacitantes (**Fig. 3.4 B**). Ver también tabla suplementaria S1.3.



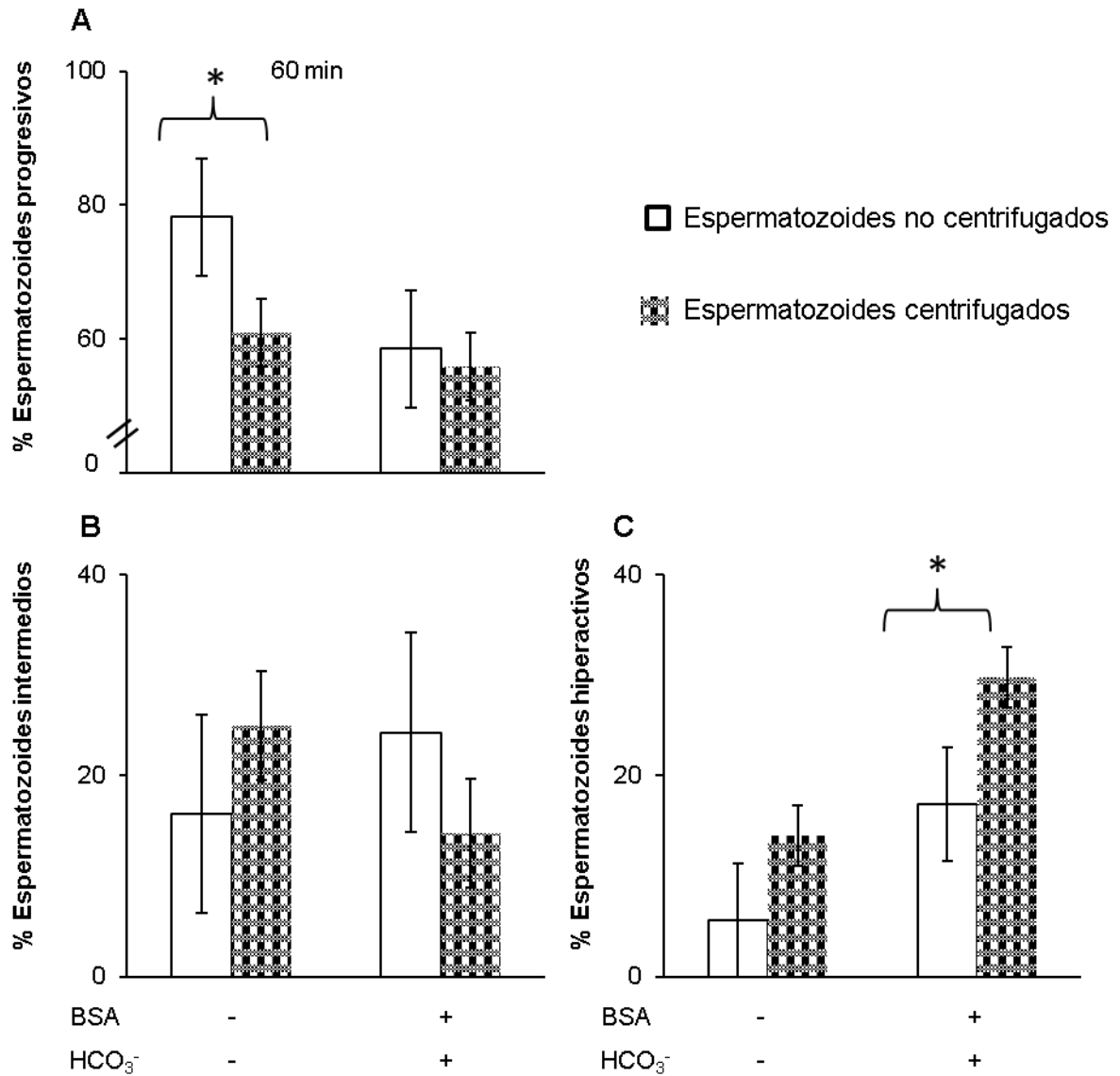
**Figura 3.4.** Porcentaje de espermatozoides móviles comparando las muestras no centrifugadas (blanco) con las centrifugadas durante 5 min a 200 x g (cuadros negros) a los 30 (A) o 60 (B) min de incubación en medios NC (BSA<sup>-</sup> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) o CAP (BSA<sup>+</sup> y HCO<sub>3</sub><sup>+</sup>). Se muestran la media ± SEM. Las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto a la muestra no centrifugada del mismo medio se representan mediante asteriscos.

Las muestras centrifugadas del medio NC no manifestaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides vivos respecto al control a lo largo de la incubación (**Fig. 3.5 A**). En las muestras centrifugadas del medio CAP, el porcentaje de espermatozoides vivos (**Fig. 3.5 B**) y el porcentaje de espermatozoides vivos sin acrosoma (**Fig. 3.5 C**), fue significativamente ( $p < 0.05$ ) inferior respecto al control, a los 30 min de la incubación, sin detectarse diferencias significativas al final de esta. Ver tablas S1.1 y S1.2.

El porcentaje de espermatozoides progresivos disminuyó significativamente con la centrifugación a los 60 min de incubación en el medio NC (**Fig. 3.6 A**), sin observarse diferencias significativas en el resto de las clases espermáticas. En el medio CAP, el porcentaje de espermatozoides hiperactivos (HA) aumentó significativamente con la centrifugación, a los 60 min de incubación (**Fig. 3.6 C**), sin presentarse diferencias en el resto de las clases. Ver tabla S1.4.

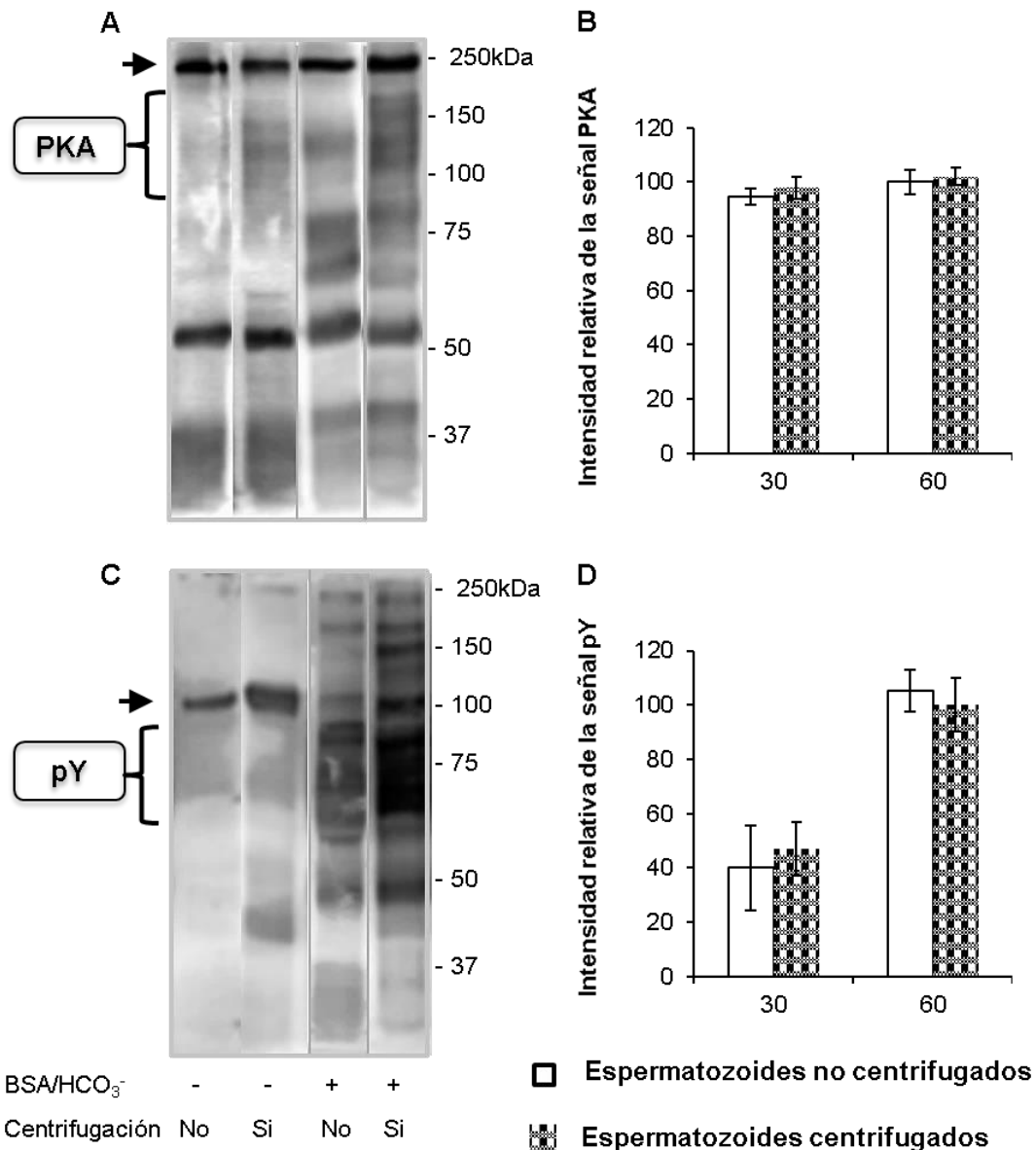


**Figura 3.5.** Porcentaje de espermatozoides vivos, y estado del acrosoma, comparando las muestras no centrifugadas (blanco) con las centrifugadas (trama de cuadros negros). Porcentaje de espermatozoides vivos a los 60 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) (A) o en condiciones capacitantes (CAP) (B). Porcentaje de espermatozoides vivos sin acrosoma a los 60 min de incubación en medio CAP (C). Se muestran la media  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto a la muestra no centrifugada incubada en el mismo medio de cultivo, se representan mediante asteriscos. Las letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las muestras.



**Figura 3.6.** Variaciones en el porcentaje de cada clase espermática a los 30 y 60 min de incubación en medio NC (BSA<sup>-</sup> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) o CAP (BSA<sup>+</sup> y HCO<sub>3</sub><sup>+</sup>), en las muestras no centrifugadas (blanco) o centrifugadas a 200 x g durante 5 min (cuadros): Progresivos (A); intermedios (B) e hiperactivos (C). Cada clase espermática se determinó en función de los parámetros de trayectoria y velocidad según los algoritmos de clasificación del software CASAnova. Se muestran la media ± SEM. Las diferencias significativas (p<0.05) respecto a la muestra no centrifugada, se representan mediante asteriscos. Nótese que por mantener un equilibrio de tamaño, las figuras no están a escala (véase la gradación del eje de ordenadas).

No se observaron diferencias en los patrones de fosforilación de proteínas, ni en la intensidad relativa de la señal debidas a la centrifugación, a los 60 min de la incubación en medio capacitante (**Fig. 3.7**). Ver tabla S1.5.



**Figura 3.7.** Efecto de la centrifugación sobre el patrón de fosforilación de proteínas de la capacitación, a los 60 min de incubación en medio capacitante. *Blots* de proteínas fosforiladas por PKA (pPKA) (A) y en residuos de tirosina (pY) (C). La intensidad relativa de la señal de las bandas englobadas por la llave fue obtenida por densitometría, normalizando mediante el control de carga (indicado por una flecha). En las gráficas se representan los promedios  $\pm$  S.E.M de la señal de pPKA (B) y de pY (D) de todas las condiciones experimentales. El patrón de peso molecular se indica a la derecha. Muestras sin centrifugar (blanco) y muestras centrifugadas a 200 x g durante 5 min (cuadros). Los carriles 1 y 3 de ambos *blots* muestran el patrón proteico típico de espermatozoides no capacitados y capacitados, respectivamente, tanto para pPKA (A) como de pY (C).

Para evaluar la cinética espermática, se analizaron los parámetros de velocidad (VCL, VAP y VSL) y de trayectoria (STR, LIN, BCF, ALH y WOB) generados por SCA, ver tablas S1.6 y S1.7. Estos parámetros fueron analizados mediante Análisis de Componentes Principales (PCA). Los datos del PCA se describen en la **tabla 3.2** y en la **figura 3.8**. Sólo se analizaron las muestras incubadas en el medio CAP, al ser la capacitación la principal variable de estudio. Además, para determinar si las variaciones encontradas en los parámetros de la cinética espermática son debidas a la predominancia de una u otra clase espermática, todos los parámetros fueron analizados según esta última.

OSV1 representa la velocidad de los espermatozoides; valores de OSV1 más altos, significan movimientos más veloces de los espermatozoides. Debido a que OSV2 explica menos del 10% de las variaciones detectadas para los parámetros de la velocidad, sus posibles variaciones serán tenidos en cuenta en la descripción.

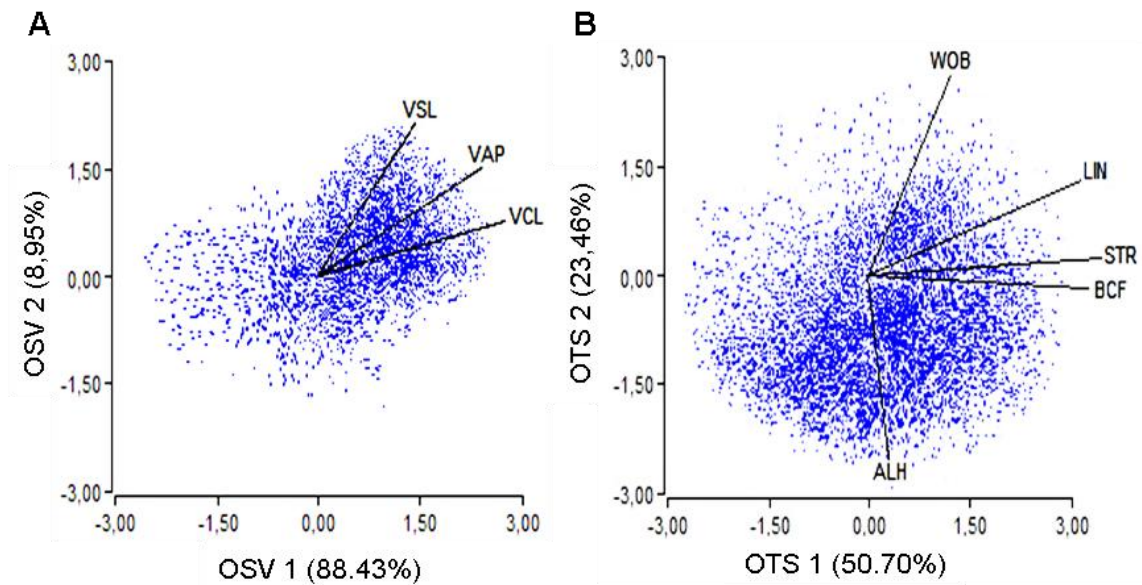
OTS1 aumenta con trayectorias más lineales y de oscilaciones más rápidas. Explica el 50,70% de la variabilidad de la trayectoria espermática.

OTS2 aumenta con movimientos laterales menos amplios y oscilantes. Explica el 23,45% de la variabilidad de la trayectoria.

**Tabla 3.2:** Contribución de cada parámetro de la cinética espermática a cada componente principal (PC).

Componente principal Parámetro	OSV 1		OSV 2		OTS 1		OTS 2	
	Autovector	R	Autovector	R	Autovector	R	Autovector	R
<b>VAP</b>	0.694	<b>0.270</b>	0.684	<b>0.249</b>	NA	NA	NA	NA
<b>VSL</b>	0.395	<b>0.721</b>	0.911	<b>1.219</b>	NA	NA	NA	NA
<b>VCL</b>	0.912	<b>1.203</b>	0.392	<b>0.717</b>	NA	NA	NA	NA
<b>ALH</b>	NA	NA	NA	NA	0.067	<b>0.199</b>	-0.766	<b>-0,558</b>
<b>BCF</b>	NA	NA	NA	NA	0.718	<b>0.398</b>	-0.056	-0,023
<b>STR</b>	NA	NA	NA	NA	0.937	<b>0.483</b>	0.099	0,092
<b>LIN</b>	NA	NA	NA	NA	0.806	<b>0.322</b>	0.524	<b>0,200</b>
<b>WOB</b>	NA	NA	NA	NA	0.245	<b>0.049</b>	0.851	<b>0,552</b>
<b>Autovalor:</b>	88.43 %		8.95 %		50.70 %		23.46 %	

Se indica el coeficiente de correlación de cada parámetro con su PC mediante la R de Pearson. En negrita, aquellas con correlación significativa (p valor  $\leq 0.05$ ). El autovalor indica cuánto contribuye ese componente a la explicación de las variaciones observadas.



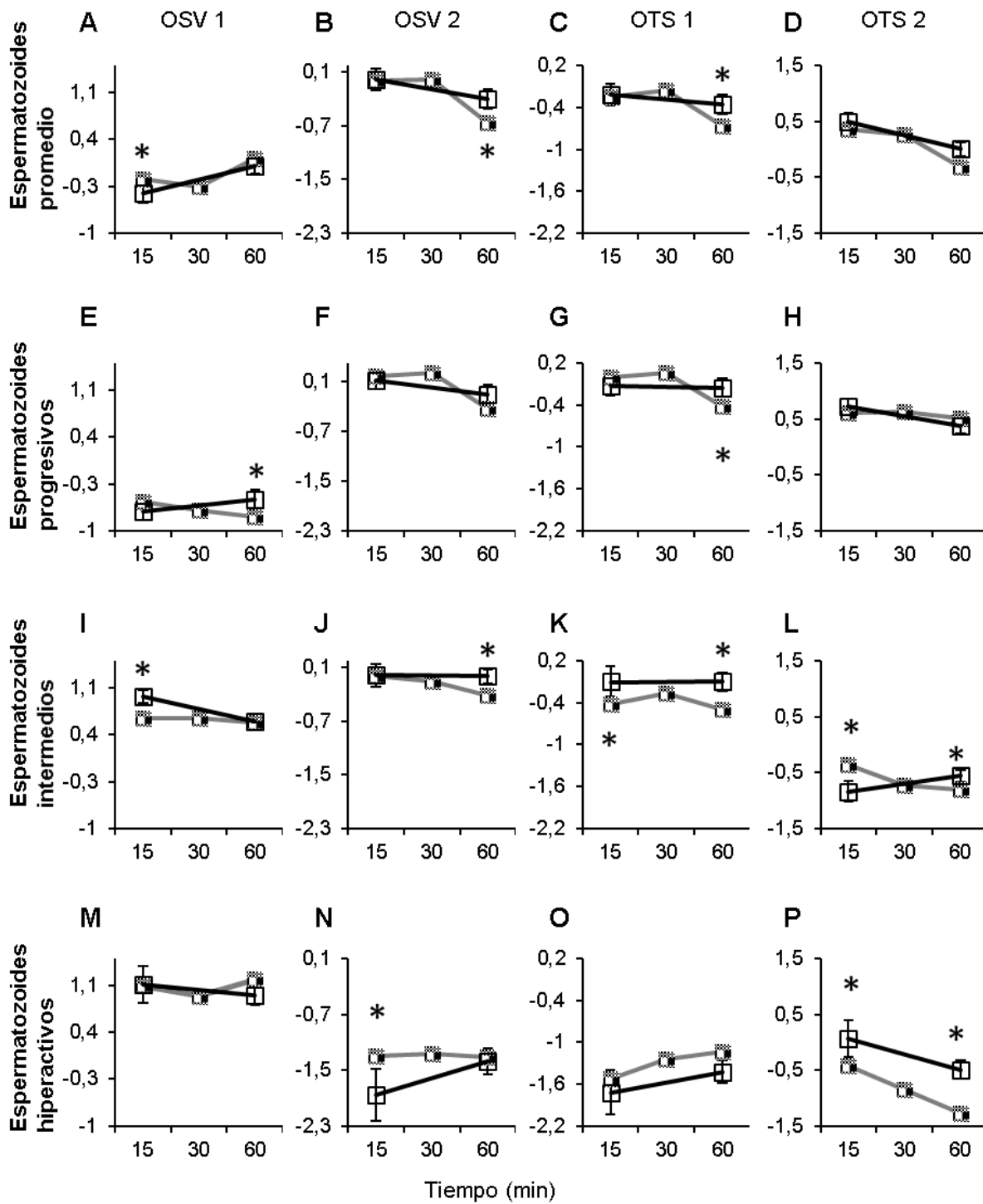
**Figura 3.8.** Análisis de componentes principales en la que se indica la contribución de cada parámetro de la cinética espermática a cada componente principal (PC). Gráfico de componentes principales de velocidad (OSV1 y OSV2) (A) y de la trayectoria (OTS1 y OTS2) (B).

A continuación, se detallan los resultados de cada componente de la cinética espermática según las distintas clases espermáticas. Ver tablas S1.8 y S1.9.

En las muestras centrifugadas, OSV1 aumenta significativamente respecto al control capacitante no centrifugado, en el conjunto de espermatozoides al inicio de la incubación (**Fig. 3.9 A**), mientras que disminuye en los intermedios (**Fig. 3.9 I**). En los progresivos OSV1 también se reduce significativamente respecto a la muestra no centrifugada, pero al final de la incubación (**Fig. 3.9 E**).

En las muestras centrifugadas, OTS1 disminuye significativamente tanto en el conjunto de los espermatozoides (**Fig. 3.9 C**) como en los progresivos al final de la incubación (**Fig. 3.9 G**), y a lo largo ésta en los intermedios (**Fig. 3.9 K**). Además, OTS2 disminuye significativamente durante toda la incubación en los espermatozoides HA de las muestras centrifugadas (**Fig. 3.9 P**).





□ Espermatozoides no centrifugados    ▨ Espermatozoides centrifugados

**Figura 3.9.** Promedio de los componentes principales de la velocidad (OSV1, OSV2) y la trayectoria (OTS1, OTS2) para los espermatozoides incubados en medio CAP, en muestras previamente centrifugadas a 200 x g durante 5 min (cuadros) o no centrifugadas (blanco). Cada fila de paneles corresponde a una clase espermática: conjunto de espermatozoides vigorosos (A-D); "progresivos" (E-H), "intermedios" (I-L) e "hiperactivos" (M-P). Se muestran la media ± SEM. Las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a la muestra no centrifugada, se representan mediante asteriscos. Nótese que por mantener un equilibrio de tamaño, las figuras no están a escala (véase la gradación del eje de ordenadas).

El conjunto de estos resultados coincide con la mayoría de las publicaciones, en las que se indica que la centrifugación de los espermatozoides de ratón genera alteraciones, principalmente en elementos relacionados con la movilidad y cinética espermática, sin que se vea afectado el perfil proteico propio de los espermatozoides capacitados. Al contrario de lo reportado por Hoogewijs y Fang (Hoogewijs *et al.*, 2010; Fang *et al.*, 2018), nuestros resultados no han mostrado efectos de la centrifugación sobre la viabilidad espermática, pero sí un incremento en el porcentaje de espermatozoides vivos con el acrosoma íntegro.

Nuestros análisis tampoco han puesto de manifiesto alteraciones en el perfil proteico (pPKA o pY), sugiriendo que la centrifugación no tiene efecto sobre la capacitación de los espermatozoides de ratón.

Hemos observado que la centrifugación aumenta el porcentaje de espermatozoides móviles en el medio de supervivencia (NC), así como el porcentaje de HA en medio CAP, coincidiendo con lo descrito por Malo (2017) y Ghallab (2019) (Malo *et al.*, 2017; Ghallab *et al.*, 2019). También hemos detectado una pérdida en el porcentaje de espermatozoides progresivos en el medio NC, y una disminución en el promedio de móviles en el medio CAP, acompañado por un incremento en el porcentaje de HA, tal y como ha sido reportado por estudios anteriores (Peña *et al.*, 2005; Muratori *et al.*, 2019). Estos efectos de la centrifugación pueden explicarse por el efecto del lavado de los espermatozoides, que pudiera estar eliminando componentes represores de la capacitación, y, por lo tanto, facilitando la desinhibición de la capacitación.

Nuestros resultados apuntan a que la centrifugación disminuye los valores de OSV2, OTS1 y OTS2 en los espermatozoides progresivos e intermedios, aproximando sus valores a los valores propios de los espermatozoides HA. Una posible explicación a estos resultados pudiera ser que, al lavar la muestra empleando la centrifugación, se eliminen inhibidores de la funcionalidad espermática procedentes del epidídimo, generando un incremento en el porcentaje de espermatozoides móviles en el medio de supervivencia y favoreciendo la adquisición del movimiento HA observada en los parámetros de la cinética espermática. Por ello, nuestros resultados coinciden con aquellos autores que consideran que el proceso de lavado espermático mediante

centrifugaciones suaves (de 5 min a 200 x g), no tiene un efecto considerable sobre la calidad espermática (Navarrete *et al.*, 2015; Ahmed *et al.*, 2016) y con aquellas publicaciones que indican que la centrifugación mejora la funcionalidad espermática (Malo *et al.*, 2017; Ghallab *et al.*, 2019), a pesar de que disminuya el porcentaje de espermatozoides “óptimos” (Punjabi *et al.*, 2018).

En vista de los resultados obtenidos, se concluye que las condiciones de centrifugación generan ciertas alteraciones en la funcionalidad espermática. Para evaluar el efecto del parámetro de estudio, y descartar los efectos del daño iatrogénico, se concluyó la necesidad de centrifugar la totalidad de las muestras, incluidos los controles, en todos los experimentos de la tesis doctoral, donde al menos una muestra necesite ser centrifugada.

### 3.10. Variaciones entre laboratorios.

Con el fin de determinar si las condiciones experimentales entre los dos laboratorios en los que se ha desarrollado esta tesis doctoral generan resultados comparables entre sí, se realizó una comparación entre los resultados obtenidos en los controles de supervivencia (NCc) y de capacitación (CAPc) en uno y otro.

Se utilizaron los resultados obtenidos en los controles (NCc y CAPc) procedentes de 3 experimentos realizados en la universidad UMass-Amherst, en el que se emplearon hasta 12 ratones CD-1 de entre 4 y 6 meses de edad, y los obtenidos en los 3 experimentos realizados en el MNCN-CSIC en el que se emplearon hasta 14 ratones CD-1 de entre 4 y 6 meses de edad. Se realizó un MLGM de todas las variables analizadas en dichos experimentos, considerando 1) la condición "laboratorio" como variable de análisis en todos los estudios estadísticos, y 2) cada uno de los 6 experimentos por separado, con la variable "tiempo, medio y laboratorio" como fijas. Los promedios y errores estándar de estos resultados se recogen en las **tablas 3.3 a 3.7**.

Únicamente se encontraron diferencias debidas al laboratorio de análisis en el VSL de los espermatozoides HA, a los 60 min de incubación (**Tabla 3.6**), siendo significativamente ( $p = 0.048$ ) más alta en el laboratorio del MNCN-CSIC ( $43,12 \pm 0,951$ ), respecto al UMass ( $40,05 \pm 1,340$ ). Estas diferencias son debidas a las diferencias entre el sistema SCA y CASAnova, así como de los aparatos de medida (microscopios y cámaras).

Nuestros resultados permiten concluir que las técnicas analíticas empleadas son robustas, generando resultados repetibles y estadísticamente comparables entre sí en ambos laboratorios, tanto en las pruebas de Wa, como en los análisis de cinética espermática.

**Tabla 3.3** Porcentaje de espermatozoides móviles en cada laboratorio tras 15, 30 o 60 min de incubación en medio de supervivencia (NC) o medio capacitante (CAP) en cada laboratorio

MEDIO	TIEMPO (min)	UMASS-AMHERST		MNCN-CSIC	
NC	15	80,96	± 2,13	79,43	± 3,05
	30	82,45	± 4,53	85,22	± 4,07
	60	75,15	± 3,63	74,26	± 3,99
CAP	15	85,25	± 1,27	86,42	± 3,27
	30	90,12	± 0,94	90,22	± 1,24
	60	78,01	± 4,20	75,31	± 3,22

Se representa promedio ± S.E.M de un conjunto de 3 + 3 experimentos realizados en cada laboratorio.

Las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) se indican mediante asteriscos.

UMass-Amherst (MA, EE. UU.) o Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC (Madrid, España).

**Tabla 3.4** Porcentaje de cada clase espermática según el laboratorio, tras 15, 30 o 60 min de incubación en medio de supervivencia (NC) o medio capacitante (CAP) en cada laboratorio.

MEDIO	TIEMPO (min)	UMASS-AMHERST			MNCN-CSIC		
		Progresivos	Intermedios	Hiperactivos	Progresivos	Intermedios	Hiperactivos
NC	15	N/A	N/A	N/A	64,41 ± 11,73	17,71 ± 2,01	17,88 ± 9,72
	30	68,52 ± 14,81	13,66 ± 4,07	17,82 ± 10,74	56,00 ± 5,96	19,44 ± 0,02	24,56 ± 5,98
	60	84,02 ± 8,07	7,04 ± 3,99	8,93 ± 4,08	68,53 ± 13,91	12,88 ± 4,46	18,59 ± 9,46
CAP	15	N/A	N/A	N/A	75,50 ± 7,84	7,16 ± 2,13	17,35 ± 5,71
	30	80,75 ± 5,24	6,22 ± 0,94	13,03 ± 6,03	77,51 ± 4,24	7,10 ± 1,36	15,38 ± 6,23
	60	78,01 ± 1,06	5,31 ± 0,13	16,67 ± 1,19	74,82 ± 3,90	6,55 ± 1,32	18,63 ± 2,58

Se representa promedio ± S.E.M de un conjunto de 3 + 3 experimentos realizados en cada laboratorio. Las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) se representan con asterisco.

UMass-Amherst (MA, EE. UU.) o Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC (Madrid, España).

**Tabla 3.5** Intensidad relativa de la señal de las muestras incubadas durante 60 min en medio de supervivencia (NC) o capacitante (CAP) en cada laboratorio.

MEDIO	UMASS-AMHERST		MNCN-CSIC	
	pPKA	pY	pPKA	pY
NC	35,27 ± 1,60	36,58 ± 5,11	36,15 ± 3,23	30,73 ± 3,37
CAP	101,59 ± 6,12	92,11 ± 6,57	99,49 ± 4,46	93,38 ± 2,91

Se representa promedio ± S.E.M de un conjunto de 3 + 3 experimentos realizados en cada laboratorio. Las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) se representan mediante asteriscos. UMass-Amherst (MA, EE. UU.) o Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC (Madrid, España).

**Tabla 3.6.** Promedio de los parámetros de velocidad espermática a los 15, 30 y 60 min de incubación en medio de supervivencia (NC) o capacitante (CAP) en cada clase espermática, entre cada laboratorio.

VCL	TIEMPO (Min)	UMASS-AMHERST			MCNC-CSIC		
		Progresivos	Intermedios	Hiperactivos	Progresivos	Intermedios	Hiperactivos
NC	15	175,31 ± 9,370	N/A	N/A	180,11 ± 5,692	263,99 ± 4,264	253,28 ± 4,480
	30	161,60 ± 4,868	231,67 ± 5,543	227,31 ± 3,609	170,38 ± 4,375	241,58 ± 4,369	233,26 ± 3,297
	60	170,51 ± 2,051	253,22 ± 4,633	243,48 ± 5,466	170,90 ± 2,181	262,59 ± 4,905	249,74 ± 5,071
CAP	15	141,69 ± 2,883	233,15 ± 5,324	224,34 ± 9,291	143,32 ± 2,440	232,15 ± 5,149	230,35 ± 6,256
	30	110,92 ± 5,435	N/A	250,06 ± 7,405	120,01 ± 4,170	240,60 ± 7,138	255,86 ± 6,332
	60	129,60 ± 2,166	225,23 ± 4,988	229,95 ± 5,215	133,11 ± 2,356	235,50 ± 5,287	239,13 ± 4,553
<b>VAP</b>							
NC	15	66,81 ± 4,657	N/A	N/A	73,38 ± 1,930	100,61 ± 2,431	86,63 ± 2,222
	30	68,43 ± 1,836	83,31 ± 2,563	76,46 ± 1,839	72,77 ± 2,558	87,46 ± 2,045	78,95 ± 1,384
	60	71,03 ± 0,958	97,78 ± 2,278	84,82 ± 1,946	72,05 ± 0,960	96,05 ± 2,471	86,02 ± 1,858
CAP	15	65,99 ± 1,364	93,60 ± 4,197	97,16 ± 4,274	66,65 ± 1,245	96,40 ± 3,317	95,58 ± 3,370
	30	59,92 ± 2,098	N/A	122,05 ± 5,967	61,33 ± 2,047	98,40 ± 4,614	114,15 ± 3,509
	60	64,27 ± 1,044	94,55 ± 3,113	98,24 ± 2,326	67,06 ± 1,996	102,15 ± 4,620	102,30 ± 2,690
<b>VSL</b>							
NC	15	49,63 ± 4,782	N/A	N/A	55,48 ± 1,839	75,00 ± 1,727	54,78 ± 1,495
	30	49,50 ± 2,788	61,83 ± 1,742	48,63 ± 1,415	54,09 ± 1,975	64,07 ± 1,463	48,94 ± 0,919
	60	54,68 ± 1,057	75,13 ± 2,104	51,01 ± 1,498	55,28 ± 0,998	73,11 ± 2,054	51,43 ± 1,456
CAP	15	45,72 ± 1,402	53,65 ± 2,176	39,88 ± 2,077	45,74 ± 1,142	56,32 ± 2,452	42,79 ± 1,605
	30	35,21 ± 1,521	N/A	39,74 ± 1,940	38,28 ± 1,782	58,70 ± 3,779	43,26 ± 1,725
	60	38,68 ± 0,834	56,40 ± 2,422	40,05* ± 1,340	40,64 ± 1,186	60,72 ± 2,435	43,12* ± 0,951

Se representa promedio ± S.E.M de un conjunto de 3 + 3 experimentos realizados en cada laboratorio.

Las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) se representan mediante asteriscos.

UMass-Amherst (MA, EE. UU.) o Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC (Madrid, España).

**Tabla 3.7.** Promedio de los parámetros de trayectoria espermática a los 15, 30 y 60 min de incubación en medio de supervivencia (NC) o capacitante (CAP) en cada clase espermática, entre cada laboratorio.

STR	TIEMPO (Min)	UMASS-AMHERST			MCNC-CSIC		
		Progresivos	Intermedios	Hiperactivos	Progresivos	Intermedios	Hiperactivos
NC	15	70,85 ± 3,29	N/A	N/A	74,65 ± 0,83	75,42 ± 1,33	63,83 ± 1,22
	30	69,66 ± 1,44	76,35 ± 1,09	64,93 ± 1,76	72,58 ± 1,58	76,83 ± 1,07	62,75 ± 1,12
	60	77,28 ± 0,51	76,82 ± 1,09	60,21 ± 1,14	76,16 ± 0,55	76,20 ± 1,00	59,78 ± 1,10
CAP	15	67,40 ± 0,82	57,85 ± 2,44	40,40 ± 2,17	66,78 ± 0,73	58,90 ± 2,33	43,39 ± 1,23
	30	62,68 ± 1,61	N/A	36,15 ± 3,95	60,49 ± 1,32	59,42 ± 2,23	41,23 ± 1,65
	60	60,20 ± 0,70	60,18 ± 2,22	43,62 ± 1,23	59,11 ± 0,68	58,21 ± 1,57	43,77 ± 0,87
<b>LIN</b>							
NC	15	28,98 ± 1,91	N/A	N/A	31,39 ± 0,60	28,27 ± 0,31	21,45 ± 0,36
	30	30,41 ± 1,04	27,09 ± 0,38	21,33 ± 0,42	31,67 ± 0,69	27,33 ± 0,33	20,72 ± 0,27
	60	35,85 ± 0,38	27,46 ± 0,45	20,79 ± 0,30	32,78 ± 0,46	27,62 ± 0,47	20,41 ± 0,31
CAP	15	34,49 ± 0,63	22,93 ± 0,56	17,29 ± 0,94	31,85 ± 0,57	24,14 ± 0,78	18,44 ± 0,36
	30	30,34 ± 1,49	N/A	16,85 ± 0,61	30,06 ± 0,99	24,16 ± 0,98	18,06 ± 1,40
	60	29,78 ± 0,52	25,79 ± 0,73	18,64 ± 0,39	28,45 ± 1,50	25,38 ± 0,57	18,14 ± 0,23
<b>WOB</b>							
NC	15	42,23 ± 1,38	N/A	N/A	43,70 ± 0,58	38,16 ± 0,69	34,11 ± 0,56
	30	43,22 ± 1,02	35,60 ± 0,64	33,27 ± 0,67	43,43 ± 0,73	35,94 ± 0,45	33,49 ± 0,42
	60	46,26 ± 0,34	36,69 ± 0,63	35,15 ± 0,55	43,42 ± 0,46	36,39 ± 0,55	34,65 ± 0,49
CAP	15	48,13 ± 0,58	40,23 ± 1,66	43,68 ± 1,92	47,45 ± 0,55	41,70 ± 1,39	41,64 ± 1,02
	30	48,02 ± 1,53	N/A	45,61 ± 6,72	49,49 ± 0,99	40,92 ± 1,61	45,07 ± 1,56
	60	49,25 ± 0,52	43,44 ± 0,93	43,65 ± 0,91	48,93 ± 0,52	44,45 ± 1,13	42,75 ± 0,76
<b>ALH</b>							
NC	15	6,92 ± 0,38	N/A	N/A	6,75 ± 0,12	8,84 ± 0,16	8,79 ± 0,15
	30	6,54 ± 0,23	10,08 ± 0,23	9,75 ± 0,22	6,69 ± 0,15	9,33 ± 0,16	9,25 ± 0,16
	60	6,68 ± 0,07	8,99 ± 0,14	8,94 ± 0,20	6,39 ± 0,28	9,19 ± 0,14	8,85 ± 0,21
CAP	15	6,57 ± 0,12	11,13 ± 0,47	11,22 ± 0,79	6,29 ± 0,18	10,70 ± 0,46	11,31 ± 0,45
	30	5,53 ± 0,24	N/A	9,40 ± 2,94	6,03 ± 0,30	12,27 ± 0,43	11,50 ± 0,41
	60	6,55 ± 0,11	10,96 ± 0,34	10,97 ± 0,56	6,75 ± 0,11	10,98 ± 0,34	11,93 ± 0,51
<b>BCF</b>							
NC	15	20,82 ± 0,80	N/A	N/A	22,15 ± 0,56	22,15 ± 0,64	20,05 ± 0,56
	30	18,78 ± 0,53	15,75 ± 0,52	15,88 ± 0,80	19,75 ± 0,46	16,86 ± 0,66	16,40 ± 0,72
	60	21,26 ± 0,47	18,96 ± 0,55	18,59 ± 0,46	21,98 ± 0,26	19,33 ± 0,56	19,23 ± 0,48
CAP	15	18,10 ± 0,39	12,81 ± 1,00	12,34 ± 1,59	17,43 ± 0,30	13,55 ± 0,89	12,08 ± 0,66
	30	17,95 ± 0,67	N/A	11,46 ± 0,54	16,95 ± 0,42	13,29 ± 0,85	11,37 ± 0,71
	60	15,74 ± 0,25	11,85 ± 0,60	11,97 ± 0,43	15,66 ± 0,22	13,06 ± 0,65	11,98 ± 0,41

Se representa promedio ± S.E.M de un conjunto de 3 + 3 experimentos realizados en cada laboratorio. Las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) se representan mediante asteriscos.

UMass-Amherst (MA, EE. UU.); Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC (Madrid, España).

## 4. EFECTOS DEL CALCIO Y DEL MAGNESIO EN LA FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA

---

### 4.1. Antecedentes

El calcio, es un elemento esencial para multitud de procesos de las células somáticas (Hollis, 2018; Stewart y Davis, 2019). Está relacionado con la movilidad (Guraya, 2000; Turner, 2006; Sánchez-Cárdenas *et al.*, 2018), desarrollo de la capacitación (Baldi *et al.*, 2000; Tulsiani *et al.*, 2007; Navarrete *et al.*, 2015), adquisición de la HA (Márquez y Suarez, 2004; Márquez *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2017; Sánchez-Cárdenas *et al.*, 2018) y de la RA (Rossato *et al.*, 2001; Márquez y Suarez, 2004; Dematteis *et al.*, 2008; Lishko *et al.*, 2012).

El magnesio es un catión divalente perteneciente al grupo de los metales alcalinotérreos como el calcio. Sin embargo, ambos cationes suelen tener funciones opuestas en las células somáticas (Al Alawi *et al.*, 2018). Diversos autores han relacionado la concentración de calcio y magnesio en el líquido seminal con la calidad de los espermatozoides y la capacidad de fecundación masculina (Sørensen *et al.*, 1999; Valsa *et al.*, 2015, 2016), sugiriéndose que el magnesio es un catión de relevancia para la funcionalidad espermática (Kasperczyk *et al.*, 2015; Al Alawi *et al.*, 2018; Hashemi *et al.*, 2018), especialmente regulando la cinética espermática (Sørensen *et al.*, 1999; Kasperczyk *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2016). Sin embargo, la mayoría de los grupos de investigación no han encontrado relación entre el magnesio y los procesos de movilidad, capacitación, hiperactivación o RA en espermatozoides humanos (Lindholmer y Eliasson, 1974; Fakhri *et al.*, 1986; Stock y Fraser, 1989; Sørensen *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 2001; Valsa *et al.*, 2016, 2012, 2015; Kasperczyk *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2016; Babaknejad *et al.*, 2018; Hashemi *et al.*, 2018). Por otra parte, existen indicios de la importancia del magnesio como antioxidante, al ser cofactor de la superóxido dismutasa (Mg-SOD) y estimular la síntesis *de novo* de glutatión en espermatozoides (Wong *et al.*, 2001; Kasperczyk *et al.*, 2015; Babaknejad *et al.*, 2018; Hashemi *et al.*, 2018).

Debido a la similitud entre ambos cationes, y las funciones antagónicas del calcio y magnesio en las células somáticas, los objetivos de este capítulo han sido



estudiar de manera integrada, el efecto del calcio y del magnesio en la funcionalidad espermática de ratones, analizando su efecto *in vitro* sobre la movilidad, cinética espermática, hiperactivación y desarrollo de la capacitación.

#### 4.2. Metodología particular

Se aplicó la metodología general de esta tesis, usando medio TYH sin calcio ni magnesio en el proceso de *swim-out*, así como un lavado de 5 min a 200 x g. Este lavado se realizó con el fin de eliminar parte del calcio y el magnesio residual de origen epididimario que pudiera quedar en la muestra. Sin embargo, este lavado no permite su eliminación total, por ello, en algunas muestras se añadió 1 mM del quelante EGTA, ya que se ha determinado que es una concentración suficiente para eliminar el calcio y magnesio presente.

Para el ajuste de la concentración celular, la suspensión espermática fue diluida en medio NC o CAP con las concentraciones de calcio, magnesio o EGTA indicados en la **tabla 4.1**.

El diseño experimental de este bloque consta de dos series:

- En la primera, realizada en la universidad de Amherst (UMass), se utilizaron 10 ratones CD-1 de entre 4 y 6 semanas de edad. La suspensión espermática obtenida de cada ratón, fue dividida en un total de 14 muestras cada vez, según lo indicado en la parte superior de la **tabla 4.1**. Cada muestra fue analizada siguiendo la metodología general, para analizar la cinética espermática (CASA<sub>nova</sub>), y para la determinación del perfil proteico de la capacitación mediante *Western-blot* (WB).
- La segunda serie fue realizada en los laboratorios del MNCN-CSIC, empleando un total de 6 ratones (parte inferior de la **tabla 4.1**), en las mismas condiciones que durante la primera serie experimental, descartando las muestras sin ambos cationes, al ser espermatozoides inmóviles y sin cambios en los patrones de fosforilación. Además, en las muestras sin uno de los cationes, se incorporó el catión ausente tras 10 min de incubación. En este caso, analizó la cinética espermática mediante el software SCA.

-

**Tabla 4.1:** Diseño experimental asociado al capítulo 4.

Serie 1		N = 10 ratones												
Muestras	NC control	CAP control	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
BSA/NaHCO <sub>3</sub>	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+
Ca <sup>2+</sup> (1,71 mM)	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Mg <sup>2+</sup> (1,2 mM)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
EGTA (1 mM)	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+

Serie 2		N = 6 ratones									
Muestras	NC control	CAP control	1	2*	3	4*	5	6*	7	8*	
BSA/NaHCO <sub>3</sub>	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	
Ca <sup>2+</sup> (1,71 mM)	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	
Mg <sup>2+</sup> (1,2 mM)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
EGTA (1 mM)	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	

\*Muestras duplicadas para posterior adición de calcio y/o magnesio.

### 4.3. Resultados

#### 4.3.1. Efectos generales sobre la calidad espermática

El porcentaje de espermatozoides vivos se evaluó únicamente en las muestras incubadas en el medio capacitante (CAP), al ser la capacitación la principal variable de estudio de esta tesis. Ver tabla suplementaria S2.1 en el anexo 3.

En el control (CAPc), el porcentaje fue disminuyendo significativamente a lo largo de la incubación, pasando del 56% al inicio de la incubación hasta llegar al 42 % al final de esta (60 min) (**Fig. 4.1 A**). En todos los tiempos experimentales, las muestras incubadas en ausencia de calcio o de magnesio tuvieron un porcentaje de células vivas significativamente superior al de la muestra control: Los espermatozoides incubados en ausencia de calcio mostraron significativamente más espermatozoides vivos que aquellos incubados sin magnesio a los 30 y 60 min de la incubación. La muestra sin magnesio tuvo un patrón de respuesta similar al del control, con diferencias significativas a los 0 y 60 min de incubación.

Se evaluó el porcentaje de espermatozoides móviles en ambos medios de cultivo, en las distintas condiciones experimentales. Los espermatozoides incubados en el control de supervivencia (NC), mostraron un incremento de espermatozoides móviles pasando del 61% al principio de la incubación, hasta el 70% a los 60 min de esta (**Fig. 4.1 B**). Este porcentaje disminuyó

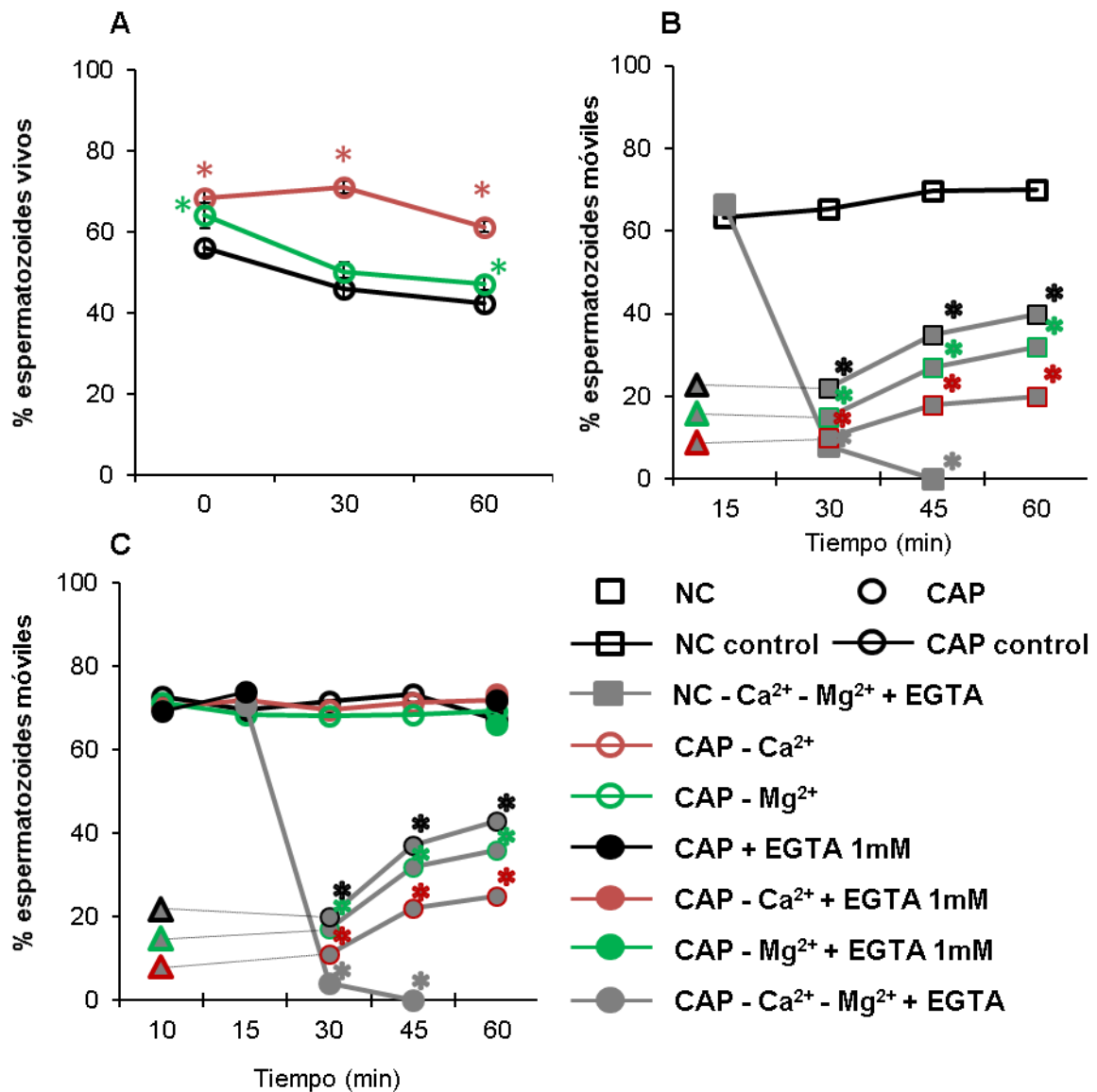
significativamente respecto al control a los 15 min en el medio NC sin calcio ni magnesio, dejando de detectarse tras los 45 min de incubación.

En las distintas muestras del medio CAP, el porcentaje de espermatozoides móviles se mantuvo constante a lo largo de la incubación, y sin diferencias entre ellas (**Fig. 4.1 C**). La única excepción fue la muestra incubada sin calcio ni magnesio, que presentó una disminución significativa a partir de los 15 min de incubación, sin presentar espermatozoides móviles a partir de los 45 min.

En las muestras NC y CAP en ausencia de ambos cationes y presencia de EGTA, se observó una pérdida de movilidad a los 30 min. A partir de los 45 min de incubación en estas condiciones, no se observaron espermatozoides móviles. Para comprobar si la reintroducción de alguno de los cationes divalentes permitía recuperar la movilidad, se añadió a un duplicado de cada muestra uno, otro o ambos cationes. Solamente al introducir magnesio (o ambos cationes) antes de los primeros 10 min de incubación se consiguió recuperar parcialmente la movilidad en ambos medios de cultivo.

#### **4.3.2. Efectos sobre la clasificación de espermatozoides**

Los espermatozoides fueron clasificados según los parámetros de cinética espermática, en base a los criterios del programa CASAnova (Goodson *et al.*, 2011). Sólo se consideraron los espermatozoides vigorosos (progresivos, intermedios e hiperactivos), al ser estos los de interés para la fecundación. Se analizó la progresión de cada clase espermática a lo largo de la incubación, comparando los resultados entre ambos controles y en función de las distintas condiciones experimentales (**Fig. 4.2**) y tablas S2.2 y S2.3.



**Figura 4.1:** Efectos de la presencia /ausencia de calcio o magnesio en el porcentaje de espermatozoides vivos en medio capacitante (CAP, círculos) (A) y en el porcentaje de espermatozoides móviles tanto en el medio de supervivencia ((NC), cuadrados) (B), como en el medio CAP (C). Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) respecto al control se muestran con un asterisco. Los triángulos representan la incorporación de calcio (rojo), magnesio (verde) o ambos cationes (negros) al medio sin cationes, a los 10 min de incubación.

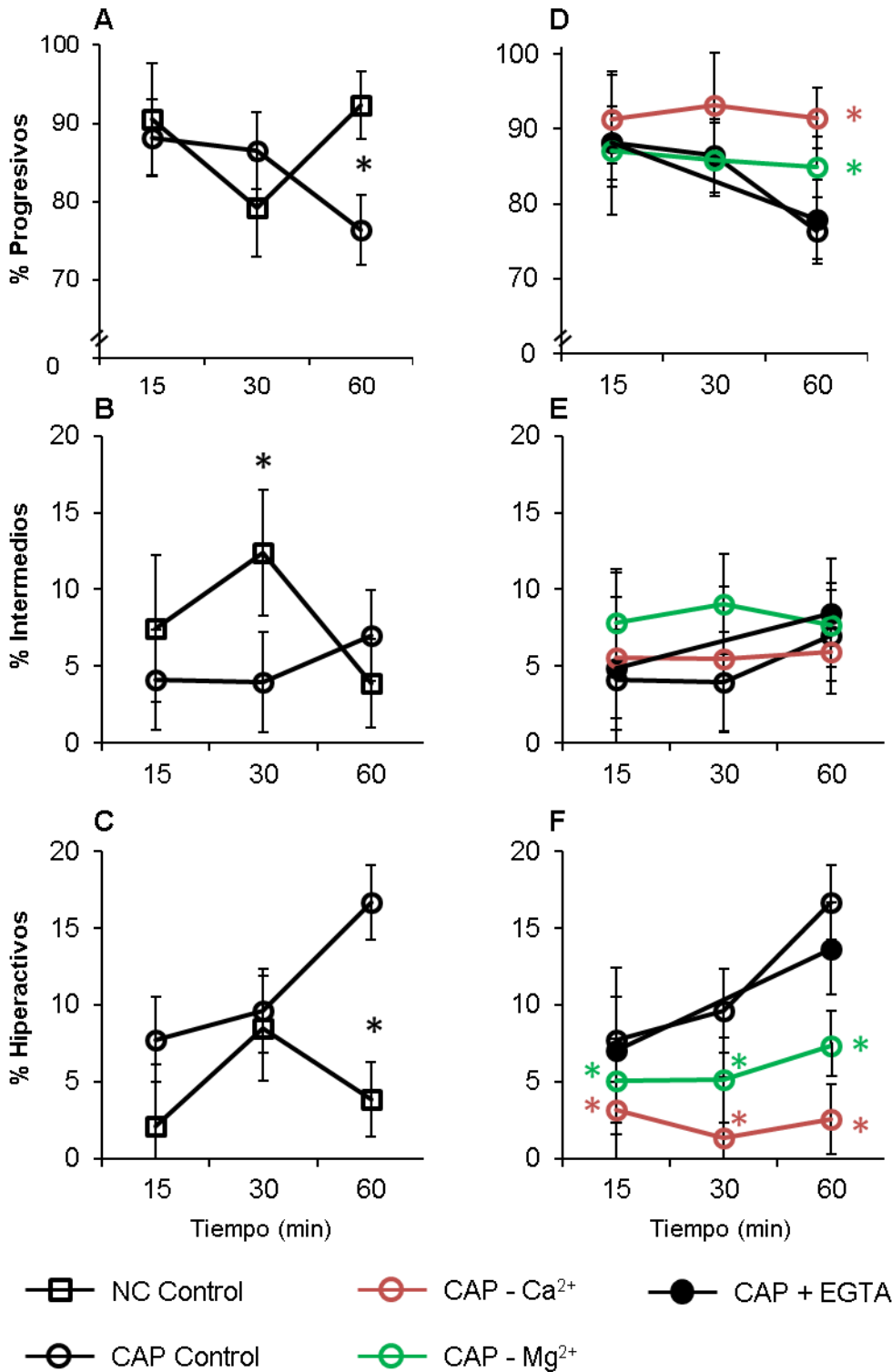
El porcentaje de espermatozoides progresivos aumentó a lo largo de la incubación en NCc, pero mostró un mínimo a los 30 min de incubación (**Fig. 4.2 A**). NCc tuvo significativamente más progresivos que CAPc a los 60 min. El porcentaje de espermatozoides HA del control de supervivencia, presentó un incremento a los 30 min de incubación, sin diferencias significativas entre los 15 y 60 min de incubación (**Fig. 4.2 C**). Este porcentaje fue menor al detectado en el control capacitante a los 60 min.

El porcentaje de espermatozoides progresivos fue disminuyendo significativamente a lo largo de la incubación en el medio CAP: Las muestras incubadas sin calcio o sin magnesio exhibieron significativamente más espermatozoides progresivos que CAPc, al final de la incubación (**Fig. 4.2 D**). El porcentaje de espermatozoides HA aumentó significativamente a lo largo de la incubación en el medio CAP (**Fig. 4.2 F**). Las muestras incubadas sin calcio ni magnesio tuvieron significativamente menos HA que CAPc a lo largo de toda la incubación, siendo menor la presencia de HA en las muestras sin calcio respecto a aquellas sin magnesio, con diferencias significativas a los 60 min. La muestra incubada en medio CAP con EGTA no tuvo diferencias significativas respecto al control en ninguna clase espermática.

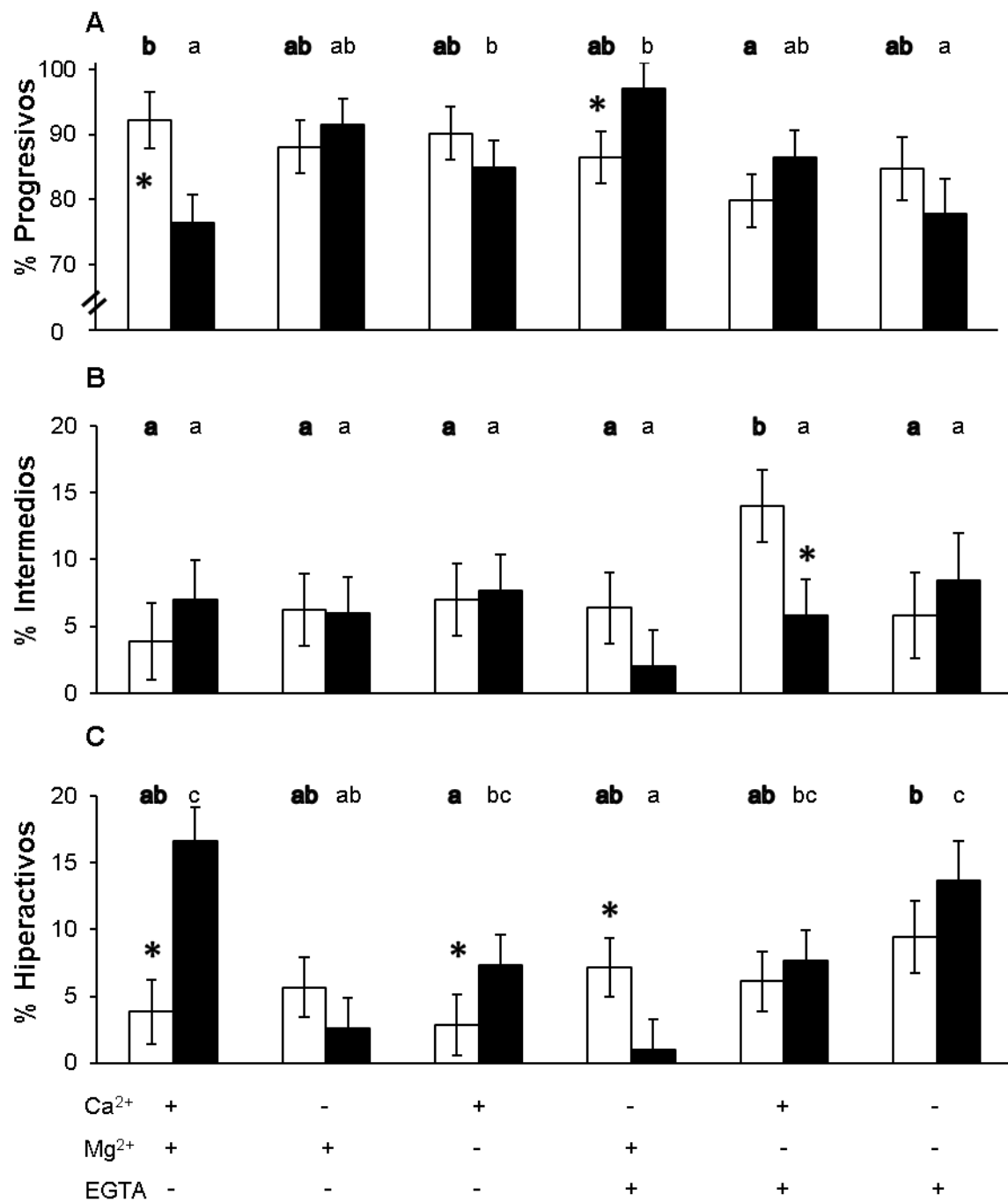
El final de la capacitación se considera a los 60 min de incubación en presencia de bicarbonato sódico, albúmina y calcio; por ello, se analizaron las variaciones observadas en las distintas condiciones experimentales en ese tiempo experimental y en ambos medios de cultivo (NC y CAP) (**Fig. 4.3**).

A los 60 min de incubación en condiciones de supervivencia, los espermatozoides incubados en el medio sin magnesio y con 1 mM de EGTA, mostraron significativamente menos espermatozoides progresivos que NCc, sin observarse diferencias en las muestras incubadas sin calcio (**Fig. 4.3 A**). El porcentaje de intermedios e HA a los 60 min de incubación no varió en las distintas condiciones experimentales (**Fig. 4.3 B y C**).

En condiciones capacitantes, los espermatozoides incubados sin calcio con el quelante EGTA, y aquellos incubados sin magnesio, manifestaron significativamente más espermatozoides progresivos que CAPc, con valores próximos a los de NCc (**Fig. 4.3 A**). Además, las muestras sin calcio (con o sin EGTA), tuvieron una disminución significativa en el porcentaje de HA respecto al control, presentando valores próximos a los del NCc en el caso de la muestra sin calcio, y significativamente inferiores a los de dicho control aquellas sin calcio y presencia del quelante (**Fig. 4.3 C**). En ambos medios de cultivo, la inclusión de 1 mM de EGTA en el medio completo, no causó diferencias significativas respecto al control en ninguna clase espermática.



**Figura 4.2:** Porcentaje de cada clase de espermatozoides de la categoría vigorosos: progresivos (A, D), intermedios (B, E) e hiperactivos (C, F). Muestras incubadas durante 60 min en medio no capacitante (NC) o capacitante (CAP) completos (A-C). Muestras incubadas durante 60 min en medio CAP sin calcio, sin magnesio o en presencia de 1 mM de EGTA (D-F). Se representa el promedio  $\pm$  S.E.M. Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) respecto al control CAP se indican mediante asteriscos. Nótese que por mantener un equilibrio de tamaño, las figuras no están a escala (véase la gradación del eje de ordenadas).



**Figura 4.3:** Variaciones en el porcentaje de cada clase espermática a los 60 min de incubación. Espermatozoides progresivos (A), intermedios (B) e hiperactivos (C). Se muestran promedios ± S.E.M. Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos están indicadas por letras (negrita = NC, simple = CAP), y aquellas entre medios, mediante asteriscos. Medio NC: barras blancas. Medio CAP: barras negras. Ca<sup>2+</sup> = calcio 1.71 mM, Mg<sup>2+</sup> = magnesio 1.2 mM, EGTA = EGTA 1 mM. Nótese que por mantener un equilibrio de tamaño, las figuras no están a escala (véase la gradación del eje de ordenadas).

### 4.3.3. Efectos sobre la señalización espermática del proceso de la capacitación

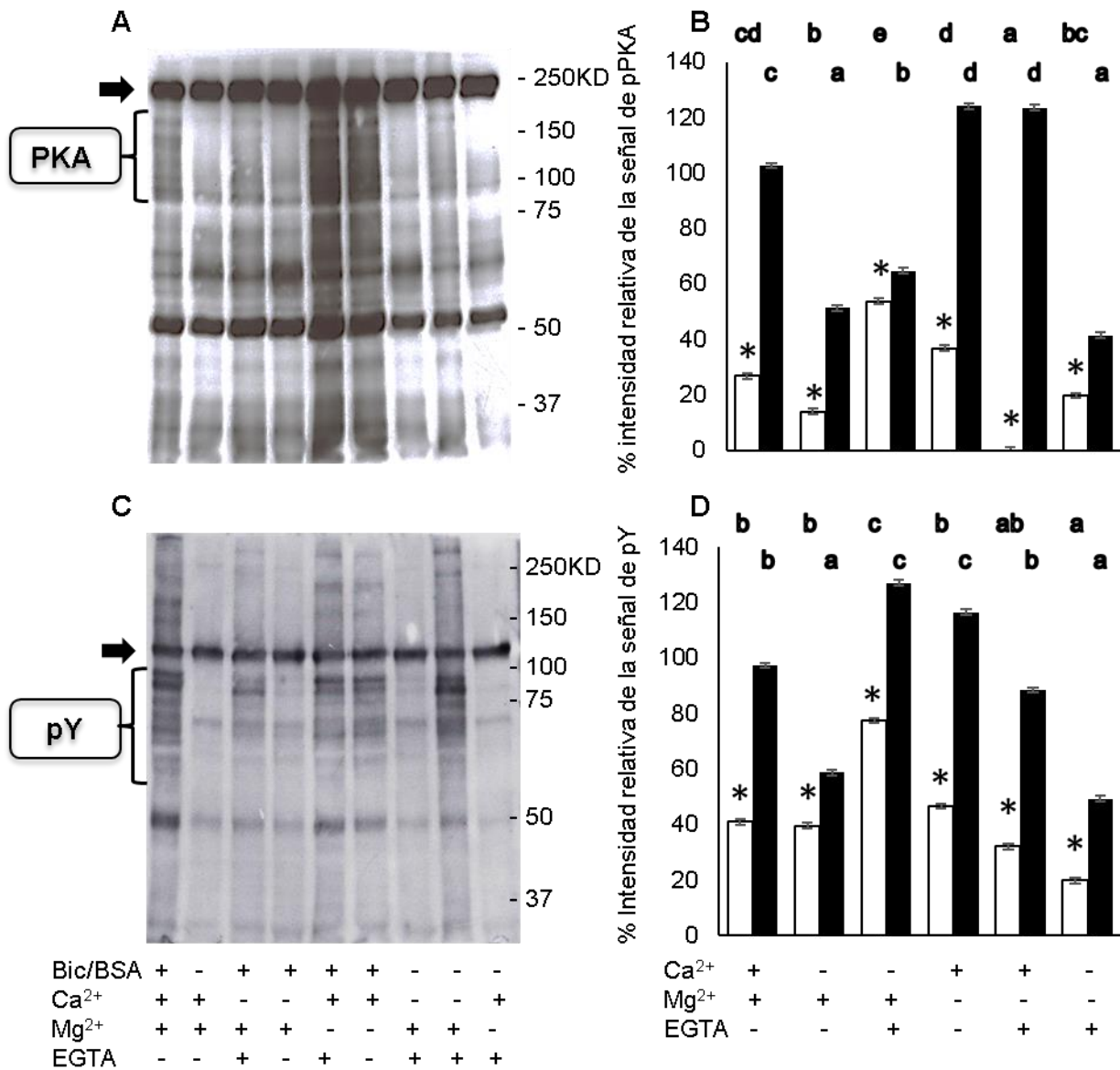
Para determinar cómo la presencia de calcio o magnesio en el medio influye en la señalización celular de la capacitación, se analizaron mediante WB las dos vías de señalización (pPKA y pY) asociadas a este proceso. Además, se cuantificó la intensidad de la señal mediante la densitometría de las bandas, para evaluar estadísticamente los datos obtenidos. Estos resultados se muestran en la **Figura 4.4** y en la tabla S2.4, y se describen a continuación. Dado que los *blots* empleados tienen 10 carriles, en la figura 4.4 se han incluido aquellos más representativos de todos los realizados, mientras en las gráficas de densitometría aparecen todos los datos obtenidos.

El patrón de fosforilación de los espermatozoides incubados en NCc, tiene menos bandas entre 75 y 250 kDa, que el patrón de los espermatozoides incubados en CAPc para pPKA (**Fig. 4.4 A**). Ocurre igual con el patrón de fosforilación de pY, que tiene una única banda en torno a los 70 kDa en el caso de los espermatozoides incubados en el medio NCc, frente a las 9 bandas (entre 60 y 100 kDa) de los espermatozoides incubados en CAPc (**Fig. 4.4 C**). En ambos casos, la intensidad relativa de señal de NCc es significativamente inferior a la de CAPc (**Fig. 4.4 B, D**).

En condiciones de supervivencia, la muestra incubada sin calcio con EGTA mostró variaciones en el patrón de fosforilación de pPKA y de pY, aproximándose al patrón de los espermatozoides capacitados (**Fig. 4.4 A y C**). La intensidad relativa de la señal de estos ejemplares también aumentó significativamente respecto a NCc en ambas vías, sin llegar a alcanzar los valores del CAPc (**Fig. 4.4 B, D**). Tanto en los espermatozoides incubados sin calcio, como aquellas incubadas sin magnesio en presencia de EGTA, se observó una disminución significativa de la señal de pPKA respecto a NCc (**Fig. 4.4 B**). En el grupo incubado en medio sin cationes con EGTA disminuyó significativamente la señal de pY (**Fig. 4.4 D**) sin verse afectada la de pPKA o pY en el medio completo en presencia del quelante.



En condiciones capacitantes, los espermatozoides incubados en el medio sin calcio no mostraron el patrón de pY típico de capacitación (**Fig. 4.4 A y C**), y la intensidad relativa de la señal fue significativamente menor a CAPc en ambas proteínas (**Fig. 4.4 B, D**).



**Figura 4.4:** Efectos del calcio y magnesio sobre el patrón de fosforilación en espermatozoides de ratón. *Blots* de proteínas fosforiladas por PKA (pPKA) (A) y en residuos de tirosina (pY) (C). La intensidad relativa de la señal de las bandas englobadas por la llave fue obtenida por densitometría, normalizando mediante el control de carga (indicado por una flecha). En las gráficas se representan los promedios ± S.E.M de la señal de pPKA (B) y de pY (D) de todas las condiciones experimentales. Medios NC (blanco) y CAP (negro). Las diferencias significativas (p valor ≤ 0.05) entre muestras están indicadas por letras (“negrita” =NC, simple =CAP), y aquellas entre medios por asteriscos. Ca<sup>2+</sup> = calcio (1.71 mM), Mg<sup>2+</sup> = magnesio (1.2 mM), EGTA = EGTA (1 mM). No se muestran todos los tratamientos en los *blots*.

En las muestras incubadas sin calcio y con EGTA, la intensidad relativa de la señal de pPKA disminuyó significativamente respecto al CAPc (**Fig. 4.4 B**), pero aumentó la de pY (**Fig. 4.4 D**). Las muestras sin magnesio tuvieron un incremento significativo de la intensidad de la señal de ambos tipos de proteínas, sin embargo, en aquellas con EGTA, el incremento se observó sólo en pPKA (**Fig. 4.4 B**), mientras que aquellas incubadas sin cationes y con EGTA, la intensidad de la señal disminuyó tanto en pPKA como en pY.

#### 4.3.4. Efectos sobre la cinética espermática

Las observaciones microscópicas de la movilidad espermática, realizadas mediante dos estimaciones visuales independientes, indicaron que, en las muestras incubadas sin calcio, los espermatozoides tuvieron un aspecto rígido, y un movimiento progresivo, además, en el medio CAP no se observaron espermatozoides hiperactivos (HA). En las muestras incubadas en el medio CAP sin magnesio, los espermatozoides presentaron un movimiento oscilante, espástico, poco progresivo y de gran amplitud del movimiento de la cabeza. Al final de la incubación en ambos medios, la ausencia de magnesio causó un movimiento similar al hiperactivo en la mayoría de los espermatozoides.

Para complementar estas observaciones, se analizaron los datos de los 8 parámetros de la cinética espermática generados por el sistema CASAnova para los espermatozoides identificados como vigorosos (ver tablas S2.5 y S2.6). Estos datos se procesaron mediante dos Análisis de Componentes Principales (PCA), realizado tanto en los parámetros de velocidad como de trayectoria. Estos análisis generaron dos componentes de la velocidad (OSV; *Overall Sperm Velocity*), y dos de la trayectoria (OTS; *Overall sperm trajectory*). Un resumen de sendos análisis **tabla 4.2** y en la **figura 4.5**:

OSV1 representa la velocidad de los espermatozoides; valores de OSV1 más altos, significan movimientos más veloces de los espermatozoides. Debido a que OSV2 explica menos del 10% de las variaciones detectadas para los parámetros de la velocidad, sus variaciones no fueron tenidas en cuenta.

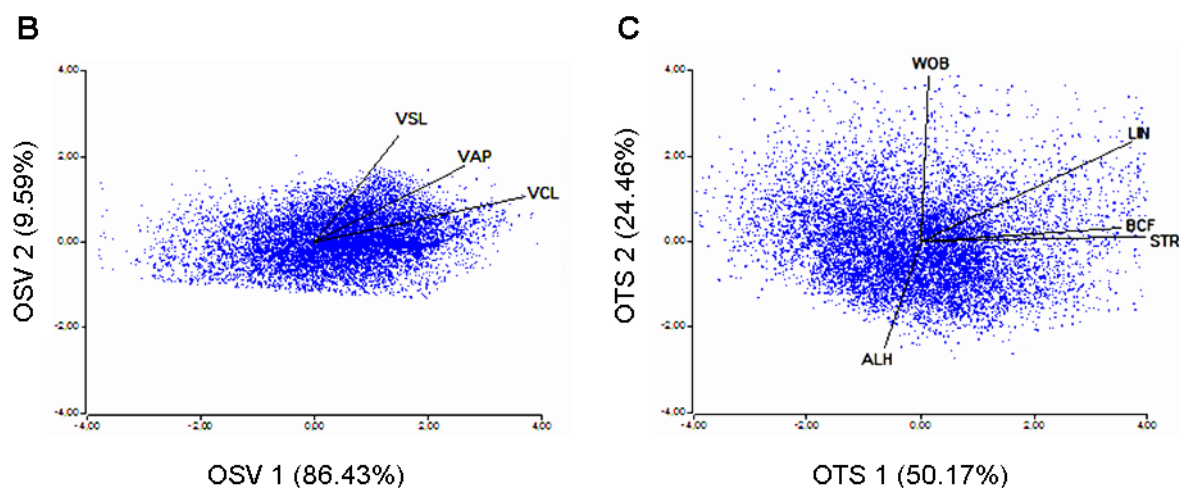
OTS1 representa la rectitud del movimiento; valores mayores de OTS1 implican una natación más lineal y una trayectoria más recta, con oscilaciones más rápidas.

OTS2 representa la oscilación del movimiento del espermatozoide; valores mayores de OTS2 implican una trayectoria menos oscilante y con valor pequeño del movimiento lateral de la cabeza.

**Tabla 4.2:** Contribución de cada parámetro de la cinética espermática a cada componente principal (PC).

Componente principal	OSV 1		OSV 2		OTS 1		OTS 2	
Parámetro	Autovector	R	Autovector	R	Autovector	R	Autovector	R
<b>VAP</b>	0.289	<b>0.693</b>	0.666	<b>0.234</b>	NA	NA	NA	NA
<b>VSL</b>	0.687	<b>0.382</b>	0.914	<b>1.202</b>	NA	NA	NA	NA
<b>VCL</b>	1.161	<b>0.915</b>	0.375	<b>0.679</b>	NA	NA	NA	NA
<b>ALH</b>	NA	NA	NA	NA	-0.130	<b>-0.081</b>	-0.762	<b>-0.442</b>
<b>BCF</b>	NA	NA	NA	NA	0.714	<b>0.410</b>	0.085	0.097
<b>STR</b>	NA	NA	NA	NA	0.937	<b>0.556</b>	-0.031	-0.177
<b>LIN</b>	NA	NA	NA	NA	0.696	<b>0.288</b>	0.620	<b>0.237</b>
<b>WOB</b>	NA	NA	NA	NA	0.023	0.018	0.931	<b>0.569</b>
<b>Autovalor:</b>	86.43 %		9.58 %		50.16 %		24.46 %	

Se indica el coeficiente de correlación de cada parámetro con su PC mediante la R de Pearson. En negrita, aquellas con correlación significativa (p valor ≤ 0.05). El autovalor indica cuánto contribuye ese componente a la explicación de las variaciones observadas.



**Figura 4.5.** Análisis de componentes principales en la que se indica la contribución de cada parámetro de la cinética espermática a cada componente principal (PC). Gráfico de componentes principales de velocidad (OSV1 y OSV2) (A) y de la trayectoria (OTS1 y OTS2) (B).

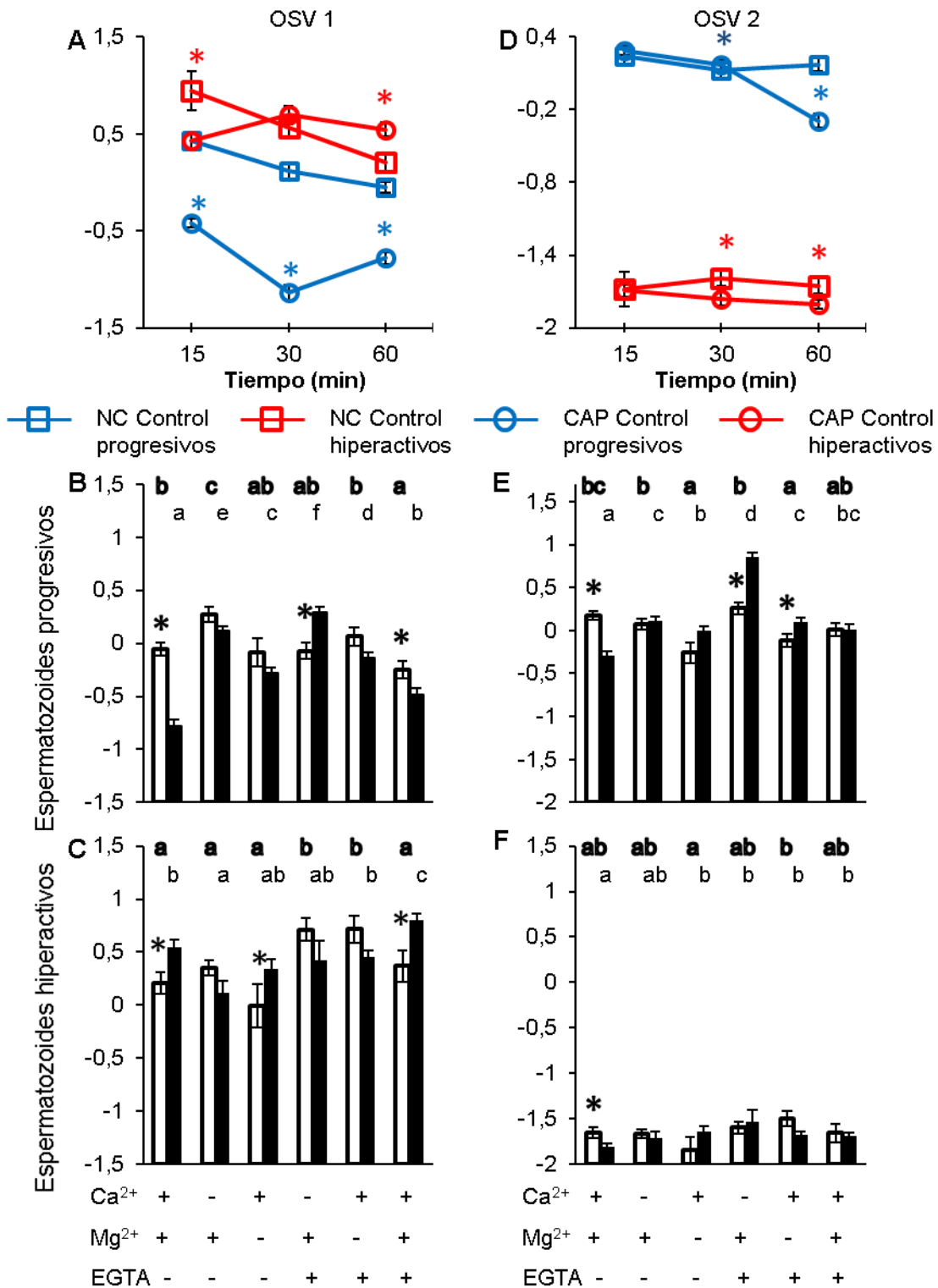
#### 4.3.5. Efectos del calcio y el magnesio sobre la velocidad espermática

La evolución temporal de OSV1 y OSV2 en los espermatozoides progresivos e HA de los controles, se ilustra en la **figura. 4.6 A y B**. El resto de la figura representa los valores de dichos componentes a los 60 min de incubación.

En ambos controles, los espermatozoides progresivos fueron significativamente más lentos que los HA (**Fig. 4.6 A**), con una velocidad significativamente superior en NCc respecto a CAPc a lo largo de toda la incubación. Los progresivos del medio de supervivencia presentaron una disminución significativa de la velocidad a lo largo de la incubación, mientras que aquellos del medio CAP, presentaron un aumento significativo entre los 30 y 60 min. En los HA de NCc, la velocidad fue estadísticamente superior a la de CAPc al inicio de la incubación, sin diferencias a los 30 min, y significativamente inferior respecto a CAPc al final de la misma (**Fig. 4.6 A**). Los HA de CAPc, mostraron un incremento significativo a los 30 min de incubación.

A los 60 min de incubación en medio NC, la muestra sin calcio tuvo un incremento significativo de OSV1 respecto al NCc en los espermatozoides progresivos (**Fig. 4.6 B**), sin embargo, fue significativamente inferior en aquellos incubados en el medio completo con EGTA, sin variaciones respecto a NCc en el resto de los tratamientos. En los HA, únicamente se observaron diferencias significativas respecto al control al incubar en ausencia de uno de los cationes en presencia de EGTA, detectándose un incremento significativo de la velocidad (**Fig. 4.6 C**).

A los 60 min, todas las muestras del medio capacitante presentaron un incremento significativo de la velocidad respecto a CAPc en los espermatozoides progresivos, siendo superior en las muestras sin calcio con EGTA, seguida de aquellas sin calcio, sin magnesio con EGTA y finalmente aquellas sin magnesio, con diferencias significativas entre todas ellas (**Fig. 4.6 B**). Los espermatozoides HA de la muestra sin calcio, presentaron una disminución significativa de la velocidad respecto a CAPc (**Fig. 4.6 C**). En la muestra incubada en medio completo con EGTA, OSV1 aumentó significativamente respecto a CAPc en ambas clases (**Fig. 4.6 B y C**).



**Figura 4.6:** Variación de OSV1 (A-C) y OSV2 (D-F). Cambios observados en el tiempo (A, D) tras 60 min de incubación en los medios NC (cuadrados) o CAP (círculo). Valores de OSV1 y OSV2 a los 60 min de incubación en medio NC (blanco) y CAP (negro) de los espermatozoides progresivos (B y E) e hiperactivos (C y F). Se muestran promedios  $\pm$  S.E.M. Las diferencias significativas ( $p$  valor  $\leq 0.05$ ) entre muestras están indicadas por letras (“negrita” =NC, simple =CAP), y aquellas entre medios mediante asteriscos. Nótese que por mantener un equilibrio de tamaño, las figuras no están a escala (véase la gradación del eje de ordenadas). Ca<sup>2+</sup> = calcio 1.71 mM, Mg<sup>2+</sup> = magnesio 1.2 mM, EGTA = EGTA 1 mM. Ver tabla S2.7 del anexo 3.

#### 4.3.6. Efectos del calcio y el magnesio sobre la trayectoria espermática

La evolución temporal de ambos componentes de la trayectoria, en los espermatozoides progresivos e HA de los controles, se ilustra en la **figura. 4.7 A y B**. El resto de la figura representa los valores de dichos componentes a los 60 min de incubación. Ver tabla S2.8 del Anexo 3.

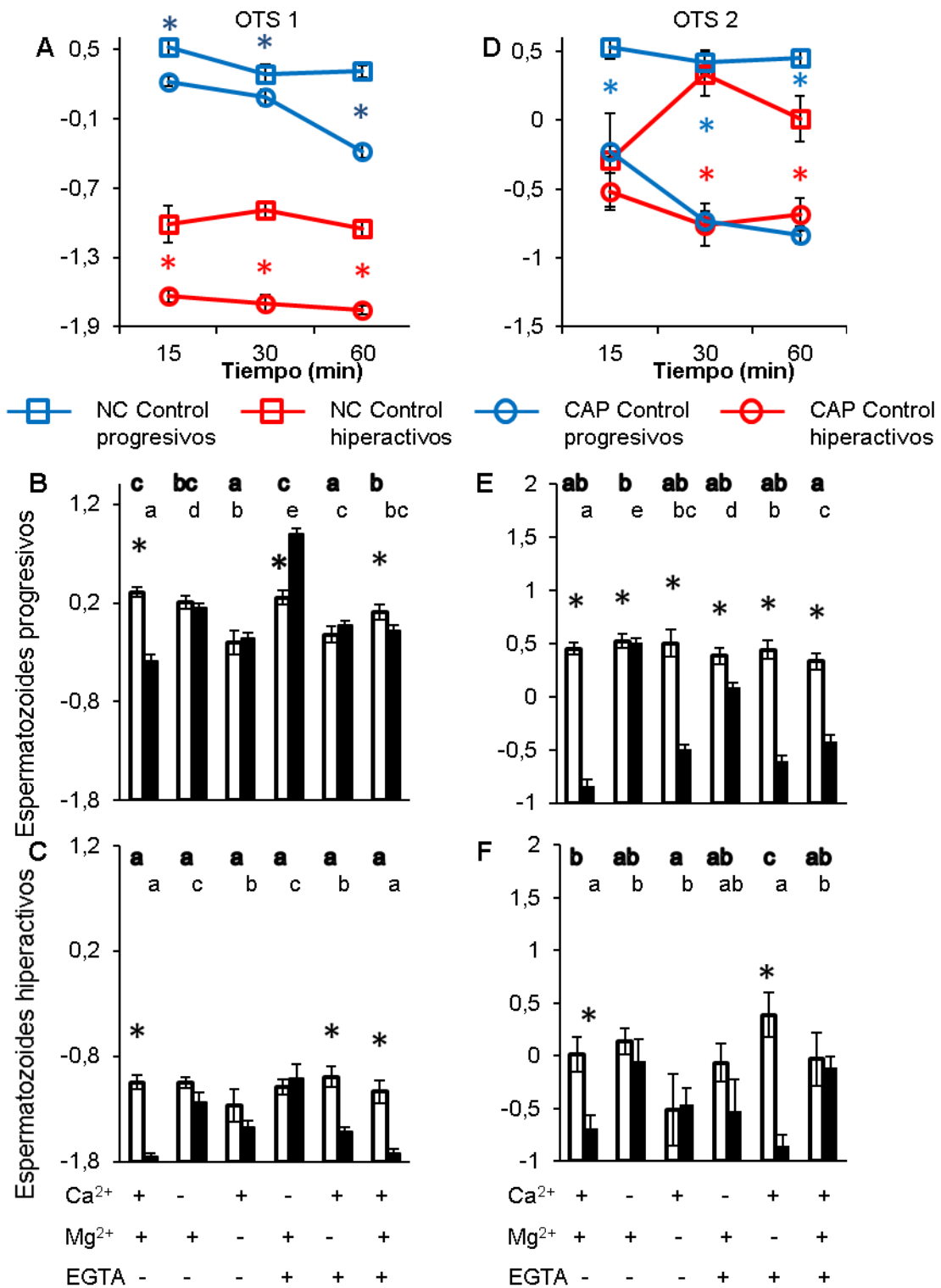
OTS1 fue significativamente superior en los espermatozoides progresivos que HA, en todos los tiempos experimentales y en ambos medios de cultivo (**Fig. 4.7 A**). En las muestras incubadas en medio de supervivencia, los espermatozoides progresivos manifestaron una disminución gradual de OTS1 a lo largo de la incubación, sin presentar diferencias significativas entre los tiempos experimentales. Los espermatozoides HA no tuvieron variaciones significativas a lo largo de la incubación (**Fig. 4.7 A**). En CAPc, los espermatozoides de ambas clases espermáticas revelaron una disminución de OTS1 a lo largo de la incubación, con diferencias significativas a los 60 min en los espermatozoides progresivos (**Fig. 4.7 A**). En ambas clases espermáticas, la OTS1 de NCc siempre fue significativamente superior a la de CAPc.

OTS2 no manifestaron variaciones a lo largo de la incubación en los espermatozoides progresivos de NCc (**Fig. 4.7 D**). En el caso de los espermatozoides HA, se detectó un incremento significativo de OTS2 a los 30 min, con posterior disminución al final de la incubación. En el medio CAPc, OTS2 disminuyó progresivamente a lo largo de la incubación, en ambas clases espermáticas, sin mostrar diferencias significativas entre clases espermáticas. Los dos componentes de la trayectoria fueron significativamente superiores en NCc en todos los tiempos experimentales.

A los 60 min de la incubación en NC, las muestras sin magnesio (con o sin EGTA), tuvieron una disminución significativa de OTS1 en los espermatozoides progresivos respecto al resto de las condiciones experimentales (**Fig. 4.7 B**). Además, la muestra sin magnesio también presentó una disminución significativa de OTS2 respecto a NCc en los espermatozoides HA, mientras los espermatozoides incubados sin magnesio en presencia de EGTA desarrollaron valores de OTS2 significativamente superiores a los del resto de las muestras

(**Fig. 4.7 F**). El medio completo con EGTA, mostró una disminución significativa de OTS1 respecto a NCc, siendo valores significativamente superiores que los de las muestras sin magnesio.

A los 60 min de la incubación en medio CAP, de igual manera que ocurre con OSV1, ambos componentes de la trayectoria aumentaron significativamente respecto a CAPc en todas las clases espermáticas (**Fig. 4.7 B, C, E y F**). El mayor incremento de OTS1 ocurrió en las muestras sin calcio, con o sin EGTA, de ambas clases espermáticas (**Fig. 4.7 B y C**). En el caso de OTS2, el mayor incremento ocurrió en la muestra sin calcio ni EGTA de los espermatozoides progresivos (**Fig. 4.7 E**). En los espermatozoides HA, el mayor incremento de OTS2 ocurrió en la muestra sin calcio, seguido de la muestra sin magnesio (**Fig. 4.7 F**). El EGTA causó un incremento significativo de OTS1 en los espermatozoides progresivos, y de OTS2 en ambas clases espermáticas.



**Figura 4.7:** Variación de los componentes principales de la trayectoria, OTS1 (A-C) y OTS2 (D-F). Cambios observados (A, D) tras 15, 30 y 60 min de incubación en los medios NC (cuadrados) o CAP (círculo). Valores de OTS1 y OTS2 a los 60 min de incubación en medio NC (blanco) CAP (negro) de los espermatozoides progresivos (B y E) e hiperactivos (C y F). Se muestran promedios ± S.E.M. Las diferencias significativas (p valor ≤ 0.05) entre muestras están indicadas mediante letras (“negrita” =NC, simple =CAP), y aquellas entre medios, mediante asteriscos. Nótese que por mantener un equilibrio de tamaño, las figuras no están a escala (véase la gradación del eje de ordenadas). Ca<sup>2+</sup> = calcio 1.71 mM, Mg<sup>2+</sup> = magnesio 1.2 mM, EGTA = EGTA 1 mM.



## 5. COMPARACIÓN ENTRE EL CLORURO DE CALCIO Y EL CARBONATO DE CALCIO AMORFO, Y SU EFECTO EN LA FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA

---

### 5.1. Antecedentes

El calcio es un catión fundamental para el organismo, ya que participa en un gran número de funciones biológicas (Hollis, 2018), incluyendo la regulación de la funcionalidad espermática (Stewart y Davis, 2019). Debido a la importancia del calcio a nivel fisiológico, es de interés identificar fuentes de calcio con mayor biodisponibilidad. El carbonato cálcico ( $\text{CaCO}_3$ ) es la sal más utilizada como fuente de calcio (Straub, 2007). El carbonato de calcio amorfo (ACC), es una forma hidratada y amorfa, considerado como el polimorfo termodinámicamente más inestable de ellos, pero 120 veces más soluble que la calcita (Nebel *et al.*, 2008; Meiron *et al.*, 2011). Debido a sus propiedades físico-químicas, y a sus particulares propiedades termodinámicas, se ha logrado sintetizar un ACC con tampón bicarbonato sódico-fosfato (PBS) (Blumenthal *et al.*, 1977; Aizenberg *et al.*, 1996; Bentov *et al.*, 2010; Meiron *et al.*, 2011; Qi *et al.*, 2014). Este ACC sintético tiene una excelente biocompatibilidad (Qi *et al.*, 2014), y supera a otros polimorfos de carbonato cálcico en su farmacocinética, biodisponibilidad (absorción intestinal) y retención (en los huesos), sin causar efectos adversos (Meiron *et al.*, 2011; Forsgren *et al.*, 2013; Shaltiel *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2014).

El objetivo de este capítulo es examinar el efecto del ACC estabilizado con PBS sobre la funcionalidad espermática de ratones CD-1, comparando su efecto, con los resultados obtenidos al incubar espermatozoides con la fuente de calcio convencional en medios de cultivo de espermatozoides ( $\text{CaCl}_2$ ).

### 5.2. Metodología particular

Se aplicó la metodología general de la tesis, incluyendo un lavado de 5 minutos a 200 x g, después del proceso de *swim-out*. Posteriormente, la suspensión espermática se dividió en diversas alícuotas, con una concentración final de  $1-2 \times 10^6$  espermatozoides/mL y se incubaron en las condiciones experimentales que se detallan a continuación (**Tabla 5.1**):

RESULTADOS

Comparación entre el cloruro de calcio y el carbonato de calcio amorfo, y su efecto en la funcionalidad espermática

Se evaluaron concentraciones crecientes de ACC, y se empleó un control negativo (medio sin calcio) y un control positivo (medio con CaCl<sub>2</sub> 1.71 mM, que es la concentración habitual de uso). Se realizaron sendos controles en cada uno de los medios, (NC o CAP). De cada ratón se obtuvo una suspensión espermática que fue analizada de manera independiente.

Los ensayos realizados se dividieron en 2 series experimentales:

- La primera sirvió para examinar el efecto de concentraciones crecientes de ACC sobre la viabilidad, movilidad y estatus acrosómico de los espermatozoides incubados en CAP, comparando los resultados tanto con el control del medio NC preparado con 1.71 mM de CaCl<sub>2</sub> (NCc), como con el equivalente del CAP (CAPc). Los ensayos realizados incluyen frotis de las muestras con la tinción de eosina, nigrosina y Giemsa, así como observaciones microscópicas de la movilidad espermática. Las muestras se analizaron a los 0, 15, 30 y 60 min.
- La segunda serie permitió evaluar, además, el efecto de las concentraciones de ACC sobre la capacitación y sobre la cinética espermática en ambos medios de cultivo, empleando para ello WB y el programa SCA, analizándolo a los 30 y 60 min.

**Tabla 5.1:** Diseño experimental empleado en el capítulo 5.

Serie	CD-1	Incubación (min)	Condiciones experimentales	MUESTRAS									
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1	5	60	BSA/HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
			CaCl <sub>2</sub> (mM)	1.71	1.71	0	0	0	0	0	0	0	0
			ACC (mM)	0	0	0	0.4	0.8	1.2	1.71	3.4	6.8	
			<b>Ensayos realizados:</b>	Viabilidad, estado de acrosoma y movilidad.									
2	3	30 / 60	<b>Condiciones experimentales</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	
			BSA/HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
			CaCl <sub>2</sub> (mM)	1.71	0	0	0	0	0	0	0	0	
			ACC (mM)	0	0	0	0.8	0.8	1.2	1.2	1.71	1.71	
<b>Ensayos realizados:</b>	Viabilidad, estado de acrosoma, cinética y capacitación.												

Concentraciones expresadas en milimolar. BSA/ HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> es presencia de BSA (10 mg/mL) y NaHCO<sub>3</sub> (15 mM).

### 5.3. Resultados

Los resultados obtenidos en el presente bloque se deben propiamente al tipo de fuente de calcio empleado en el medio de cultivo, y no a los diluyentes estabilizantes del carbonato cálcico amorfo: El ACC se estabiliza disolviéndolo en tampón PBS (Meiron *et al.*, 2011; Qi *et al.*, 2014), y el medio de cultivo utilizado comúnmente en nuestros estudios experimentales (TYH), lleva 1.2 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Además, los resultados de bajas concentraciones de ACC se corresponden con los observados por otros autores en ausencia de calcio, mientras que concentraciones de ACC superiores muestran resultados similares a las obtenidas con concentraciones equivalentes de  $\text{CaCl}_2$ . Por lo tanto, podemos asegurar que nuestras observaciones se deben a las diferentes fuentes de calcio, y no a la presencia del PBS.

#### 5.3.1. Efectos generales sobre la calidad espermática

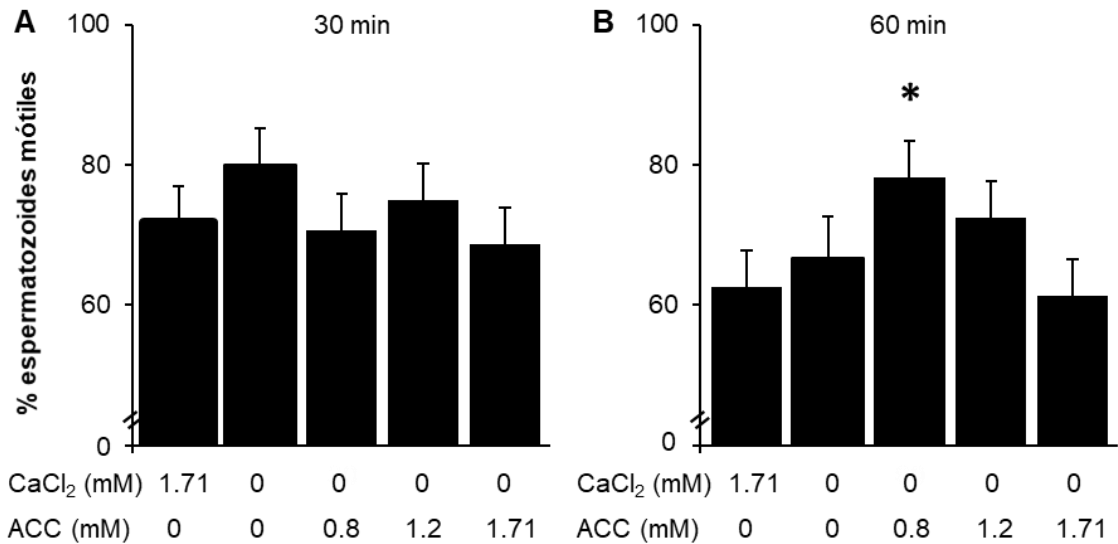
En condiciones capacitantes, el ACC mostró diferencias significativas respecto a CAPc a los 60 min de incubación con 0.8 mM de ACC, que manifestó mayor porcentaje de espermatozoides móviles respecto al resto de las muestras (**Fig. 5.1** y tabla S3.1). En el resto de las alícuotas no se detectaron variaciones en la movilidad en ningún tiempo experimental.

El porcentaje de espermatozoides vivos sin acrosoma aumentó significativamente respecto al control a los 30 min de incubación en medio CAP con 1.71 mM de ACC (**Fig. 5.2 A**). Este porcentaje disminuyó respecto al control a los 60 min de incubación en medio CAP sin calcio, o con 1.2 mM de ACC (**Fig. 5.2 B**), sin verse diferencias significativas en el resto de las muestras. Ver también la tabla suplementaria del anexo III Tabla S3.2.

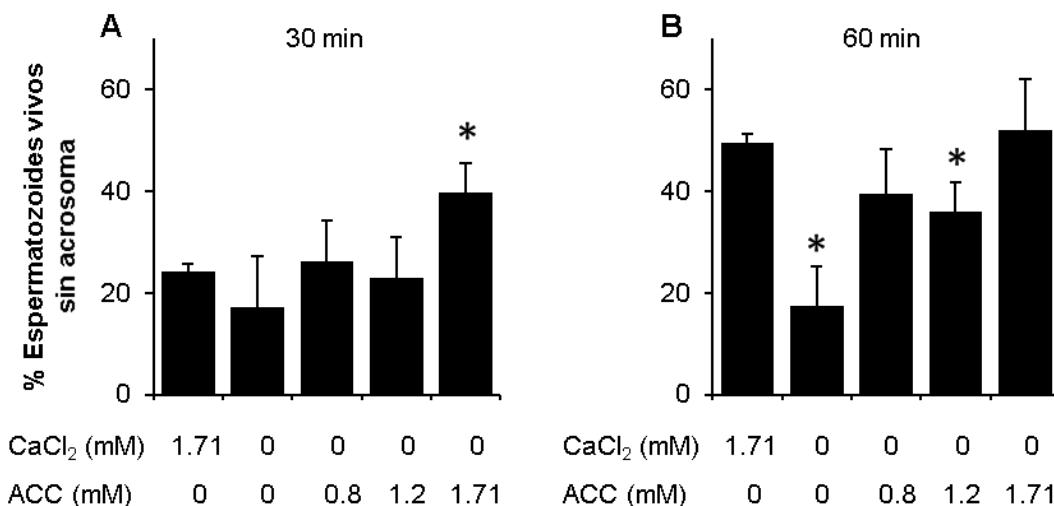
#### 5.3.1. Efectos del ACC sobre el porcentaje de cada clase espermática

El porcentaje de espermatozoides progresivos, a los 30 min de incubación, disminuyó de manera inversamente proporcional a la concentración de ACC, con diferencias significativas respecto al control en la muestra con 1.71 mM de ACC (**Fig. 5.3 A**). Del mismo modo, el porcentaje de espermatozoides HA aumentó

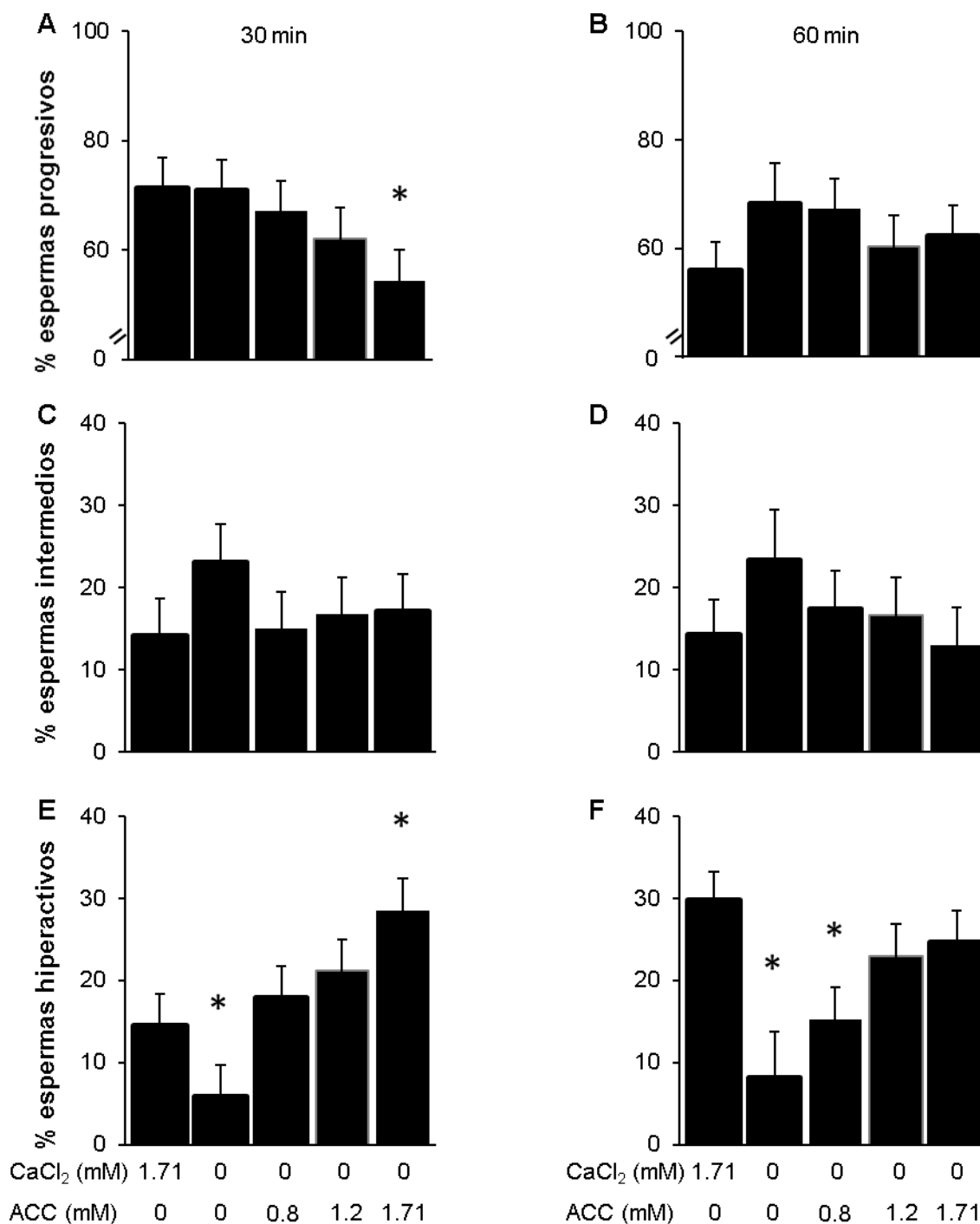
de manera proporcional a la concentración de ACC, con diferencias significativas respecto al control en la muestra con 1.71 mM de ACC (**Fig. 5.3 E**). A los 60 min, sólo se observaron diferencias significativas en la muestra con 0.8 mM de ACC, que tuvo menos espermatozoides HA que CAPc, con valores similares a los del control negativo (muestra sin calcio) (**Fig. 5.3 F**). Consultar tabla S3.3.



**Figura 5.1:** Porcentaje de espermatozoides móviles a lo largo de la incubación en medio CAP con concentraciones crecientes de carbonato cálcico amorfo (ACC). A los 30 (A) o 60 (B) min de incubación. Se representan las medias  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) respecto al control (1.71 mM CaCl<sub>2</sub>), se indican mediante un asterisco.



**Figura 5.2.** Porcentaje de espermatozoides vivos sin acrosoma tras 30 min (A) o 60 min (B) de incubación en medio CAP, con 1.71 mM de CaCl<sub>2</sub>, sin calcio, o con concentraciones crecientes de ACC. Se representan las medias  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) respecto al control (1.71 mM CaCl<sub>2</sub>), se indican mediante un asterisco.

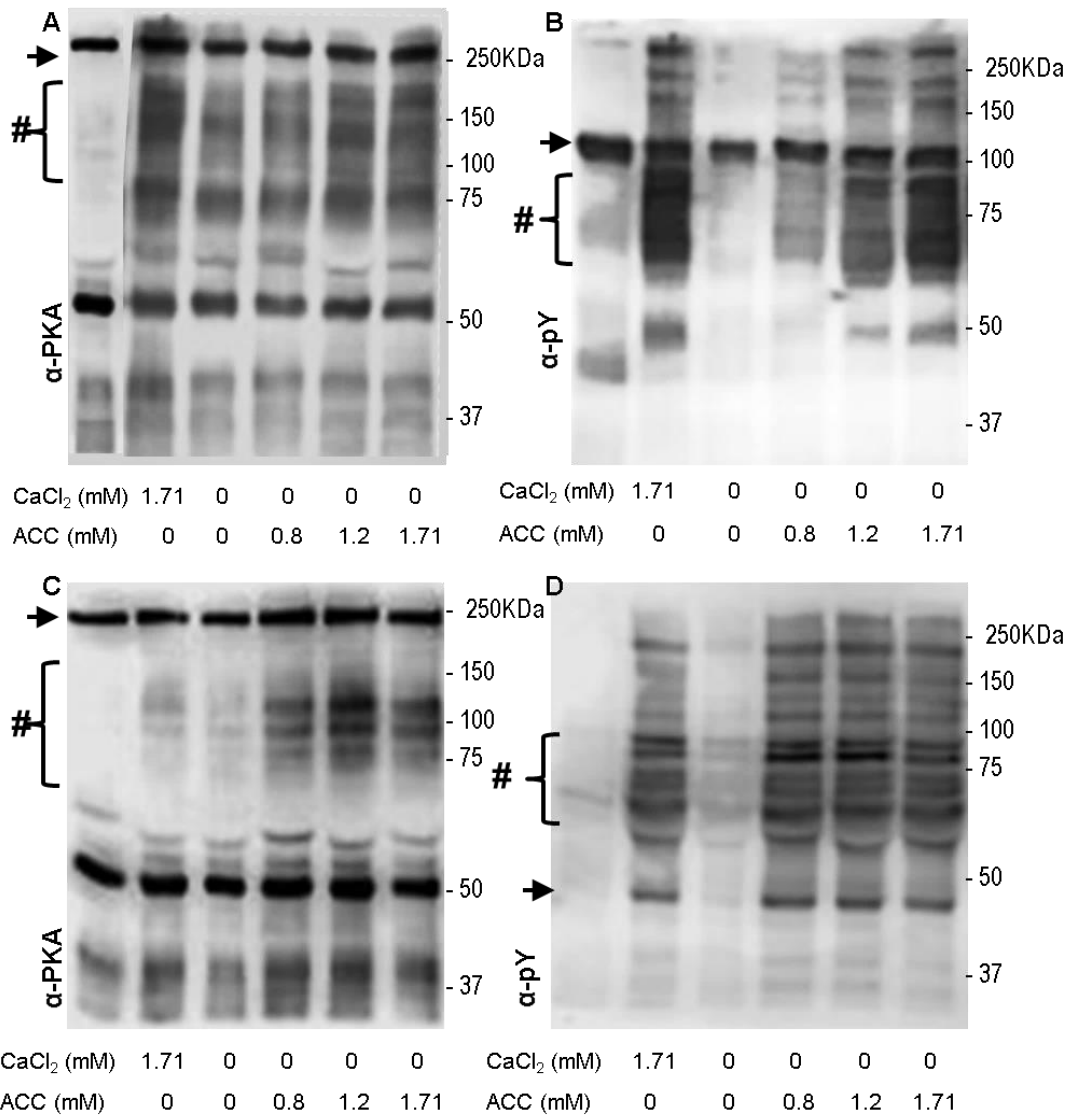


**Figura 5.3.** Porcentaje de cada clase de espermatozoides de la categoría vigorosos: progresivos (A, B), intermedios (C, D) e hiperactivos (E, F), a los 30 o 60 min de incubación en medio CAP con 1.71 mM de CaCl<sub>2</sub>, sin calcio, o con concentraciones crecientes de ACC. Se representan las medias ± SEM. Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) respecto al control (1.71 mM CaCl<sub>2</sub>), se indican mediante un asterisco. Nótese que por mantener un equilibrio de tamaño, las figuras no están a escala (véase la gradación del eje de ordenadas).

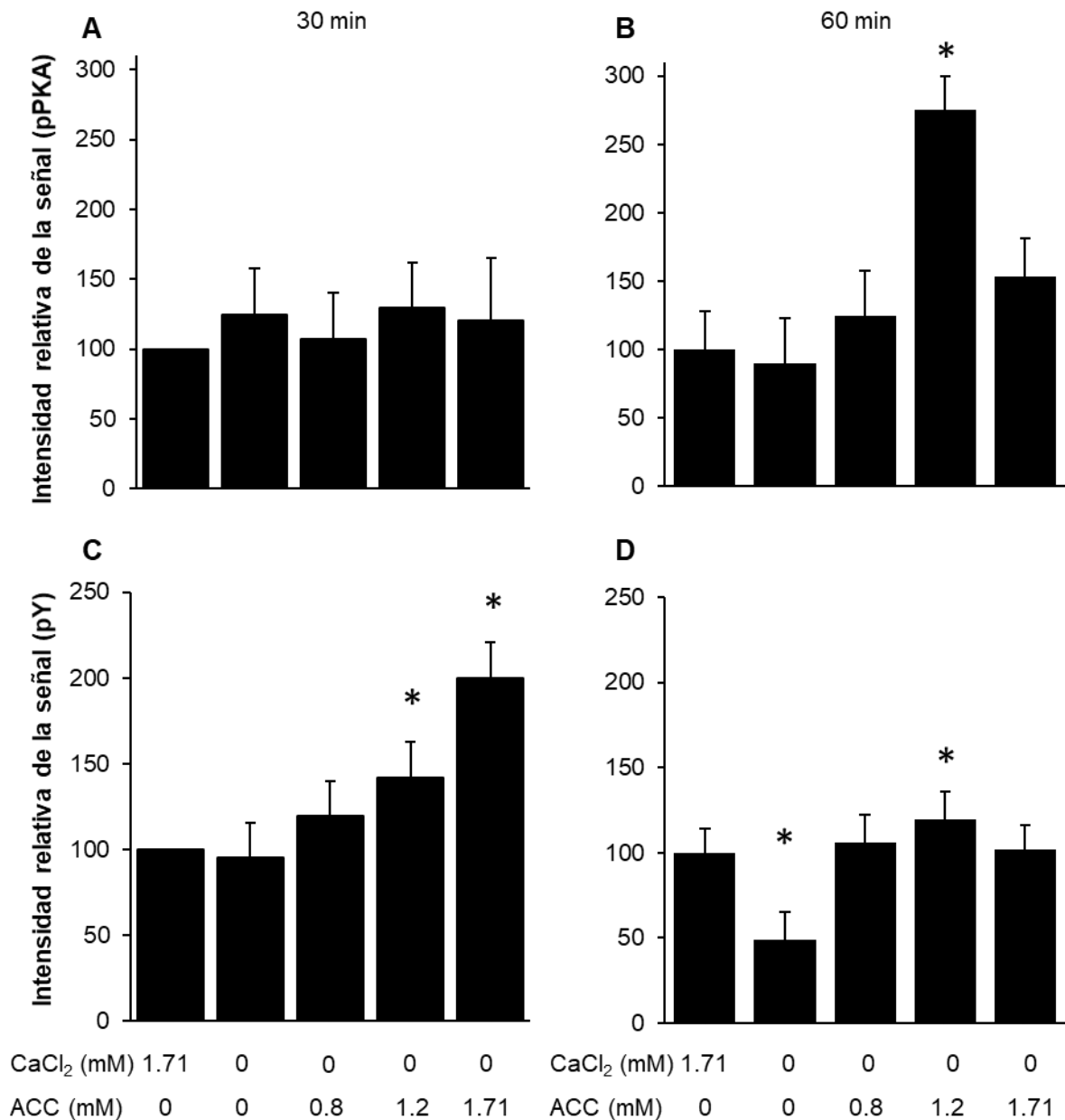
### 5.3.2. Efectos del ACC sobre la señalización espermática del proceso de la capacitación

A los 30 min de incubación en condiciones capacitantes, las muestras con 0 y 0.8 mM de ACC, tuvieron un patrón de pPKA intermedio entre los patrones de CAPc y NCc (**Fig. 5.4 A**). Además, en el caso de la muestra sin calcio, su patrón de pY fue similar al de NCc (**Fig. 5.4 B**). El resto de las muestras también presentaron un patrón de pPKA similar al de CAPc, pero con diferencias en las proteínas de 37, 60 y 75 kDa (**Fig. 5.4 A**). El patrón de pY también es parecido al de CAPc, con diferencias en el caso de las proteínas de 65 y 175 kDa de las muestras con 1.2 y 1.71 mM de ACC, que aparecen fosforiladas, de igual manera que en el CAPc a los 60 min de incubación (**Fig. 5.4 C y D**). A los 60 min de incubación, no se encontraron diferencias en el perfil proteico entre ambas fuentes de calcio (**Fig. 5.4 B y D**).

La intensidad relativa de la señal de pPKA presentó diferencias significativas respecto a CAPc únicamente en la muestra con 1.2 mM de ACC, a los 60 min de incubación, con los mayores valores de toda serie experimental (**Fig. 5.5** y Tabla S3.4), y en la de 1.2 mM de ACC a los 60 min de incubación (**Fig. 5.5 B**). La intensidad de la señal de pY aumentó significativamente respecto a CAPc en las muestras con 1.2 y 1.71 mM de ACC a los 30 min (**Fig. 5.5 C**), y en aquella con 1.2 mM de ACC al final de la incubación (**Fig. 5.5 D**). La muestra sin calcio presentó los menores valores de intensidad relativa de la señal de pY de toda la serie experimental, al final de la incubación.



**Figura 5.4.** Fosforilación de sustratos de PKA (pPKA) (A, B) y de proteínas en residuos de tirosina (pY) (C, D), tras la incubación de espermatozoides durante 30 min (A, C) o 60 min (B, D) en el medio CAP con 1.71 mM de CaCl<sub>2</sub>, sin calcio, o con concentraciones crecientes de ACC. El carril izquierdo de cada *blot* es medio NCc completo. Las bandas indicadas con la llave son las propias de la capacitación, y fueron analizadas mediante densitometría, para obtener la intensidad relativa de la señal de cada grupo de proteínas. Las flechas indican las bandas utilizadas como control de carga para densitometría. El primer carril de cada *blot* representa NCc.



**Figura 5.5.** Cuantificación de la fosforilación de sustratos de PKA (pPKA) (A, B) y de proteínas en residuos de tirosina (pY) (C, D), tras la incubación de espermatozoides durante 30 min (A, C) o 60 min (B, D) en medio CAP con 1.71 mM de CaCl<sub>2</sub>, sin calcio, o con concentraciones crecientes de ACC. La intensidad de la señal se presenta en relación con la de los controles (espermatozoides incubados en CaCl<sub>2</sub> 1,71 mM) durante un período de tiempo similar (es decir, 30 o 60 min). Se representan las medias ± SEM. Las diferencias significativas (p ≤ 0.05) respecto al control (1.71 mM CaCl<sub>2</sub>), se indican mediante un asterisco. Nótese que por mantener un equilibrio de tamaño, las figuras no están a escala (véase la gradación del eje de ordenadas).



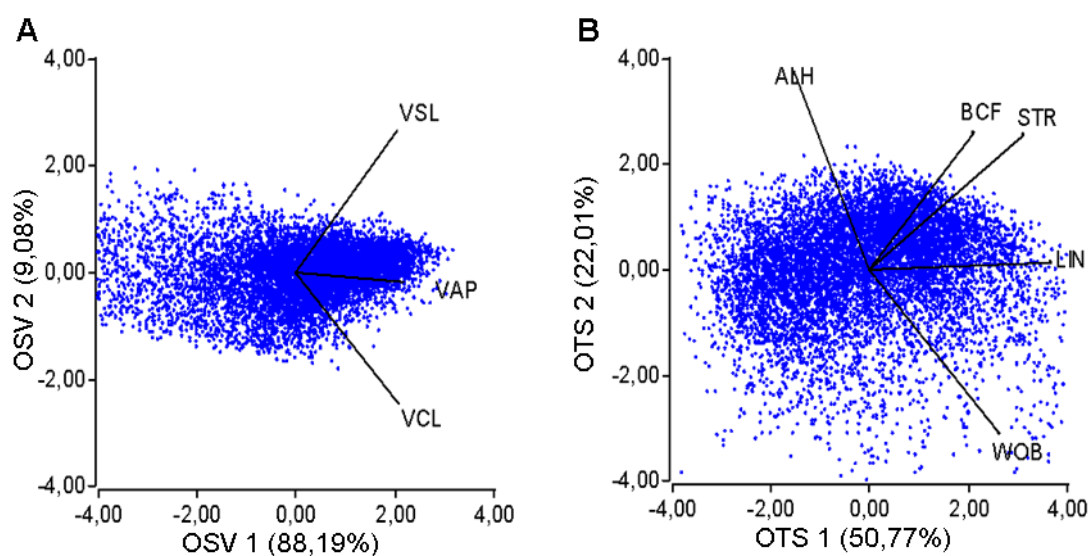
### 5.3.3. Efectos sobre la cinética espermática

Se analizaron los datos de los parámetros de la cinética espermática generados por el sistema CASAnova para los espermatozoides identificados como vigorosos (ver tablas S3.5 y S3.6 del anexo 3). Estos datos se procesaron mediante dos Análisis de Componentes Principales (PCA), realizado tanto en los parámetros de velocidad como de trayectoria. Un resumen de dichos análisis en **tabla 5.2** y en la **Figura 5.6**.

**Tabla 5.2:** Contribución de cada parámetro de la cinética espermática a cada componente principal (PC).

Componente principal	OSV1		OSV2		OTS1		OTS2	
	Autovector	R	Autovector	R	Autovector	R	Autovector	R
<b>VAP</b>	0.973	<b>0.368</b>	-0.023	-0.083	NA	NA	NA	NA
<b>VSL</b>	0.918	<b>0.347</b>	0.382	<b>1.403</b>	NA	NA	NA	NA
<b>VCL</b>	0.925	<b>0.350</b>	-0.355	<b>-1.303</b>	NA	NA	NA	NA
<b>ALH</b>	NA	NA	NA	NA	-0,402	<b>-0,153</b>	0,641	<b>0,607</b>
<b>BCF</b>	NA	NA	NA	NA	0,549	<b>0,219</b>	0,451	<b>0,382</b>
<b>STR</b>	NA	NA	NA	NA	0,822	<b>0,330</b>	0,441	<b>0,391</b>
<b>LIN</b>	NA	NA	NA	NA	0,960	<b>0,380</b>	0,022	0,0350
<b>WOB</b>	NA	NA	NA	NA	0,690	<b>0,266</b>	-0,540	<b>-0,497</b>
<b>Autovalor:</b>	88.19 %		9.08 %		50.77 %		22.01 %	

Se indica el coeficiente de correlación de cada parámetro con su PC mediante la R de Pearson. En negrita, aquellas con correlación significativa ( $p \leq 0.05$ ). El autovalor indica cuánto contribuye ese componente a la explicación de las variaciones observadas.



**Figura 5.6.** Análisis de componentes principales en la que se indica la contribución de cada parámetro de la cinética espermática a cada componente principal (PC). Gráfico de componentes principales de velocidad (OSV1 y OSV2) (A) y de la trayectoria (OTS1 y OTS2) (B).

Si definimos "trayectoria" como el movimiento real de los espermatozoides, "recorrido" como el camino que dibujan los espermatozoides a lo largo de su movimiento y "desplazamiento" como el movimiento neto de los espermatozoides, desde el punto inicial hasta el punto final del recorrido, los distintos PCA pueden ser descritos de la siguiente manera:

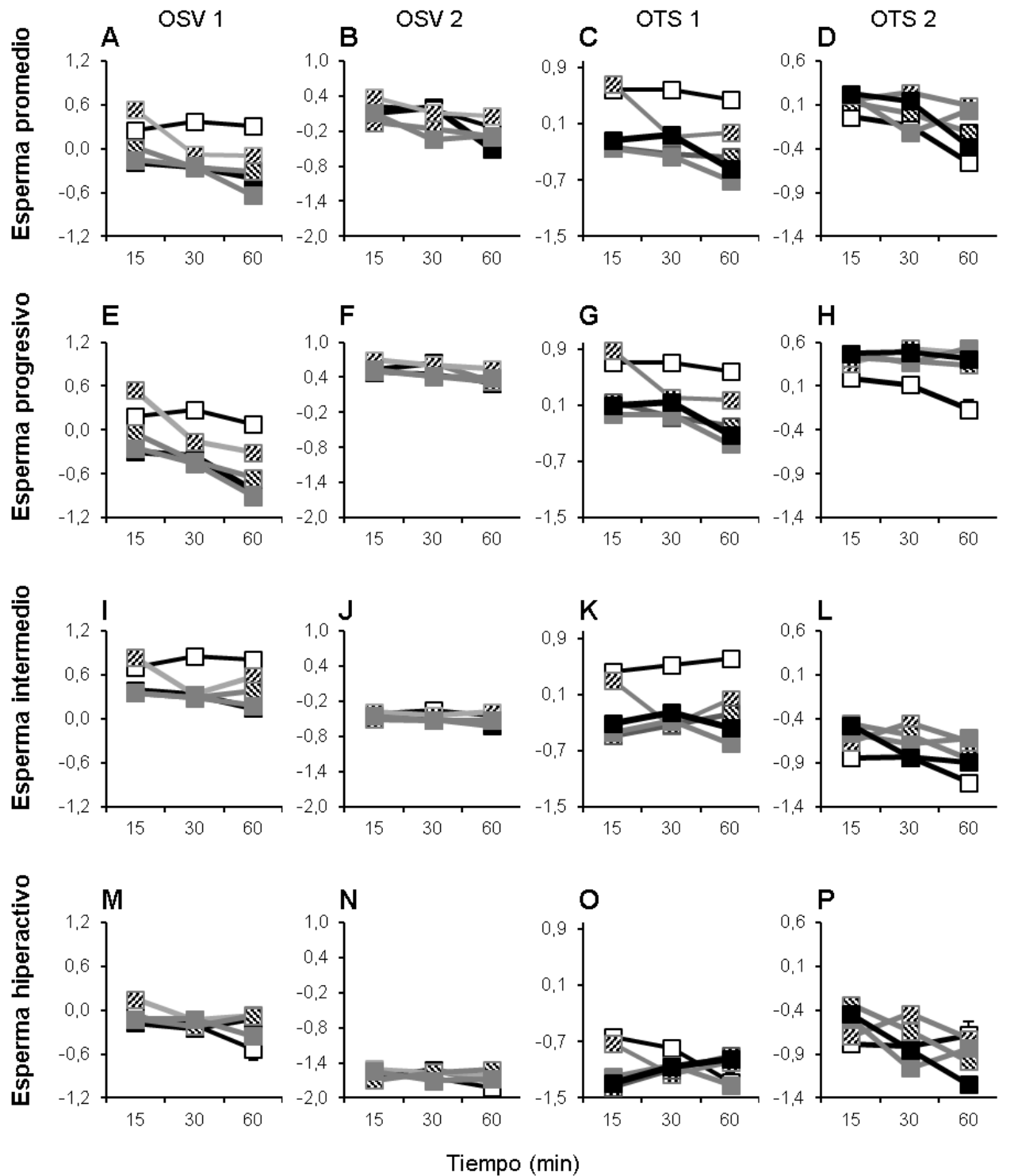
OSV1 explica las diferencias encontradas en los parámetros de velocidad de los espermatozoides (88.02%), Debido a que OSV2 explica menos del 10% de las variaciones detectadas para los parámetros de la velocidad, no será tenido en cuenta en la descripción de sus variaciones.

OST1 explica el 51.32% de las diferencias encontradas en la trayectoria, y aumenta mientras las trayectorias son más lineales y con oscilaciones más rápidas.

OTS2 explica el 21.16% de las diferencias encontradas en la trayectoria de los espermatozoides, y aumenta cuando las trayectorias presentan oscilaciones más amplias y son menos progresivas.

La evolución de cada componente a lo largo del tiempo, según las distintas condiciones experimentales del medio CAP, se ilustran en la **figura 5.7** y sus datos numéricos se indican en las tablas S3.7 y S3.8.

Las muestras incubadas con 0 o 0.8 mM de ACC, mostraron los valores de OSV1, OST1 y OST2 más altos en todos los tiempos experimentales. Esta observación se encontró tanto en el conjunto de espermatozoides progresivos como en las clases progresivos e intermedios (**Fig. 5.7 A-L**). En la clase hiperactiva, solo OST2 mostró algunas diferencias entre las muestras y el control: a los 15 min de incubación, las muestras sin calcio y con 0.8 mM de ACC, alcanzaron valores significativamente más altos que el resto de las muestras. Al final de la incubación, las muestras con 0, 0.8 y 1.71 mM ACC tuvieron valores significativamente más bajos que el resto. (**Fig. 5.7 P**).



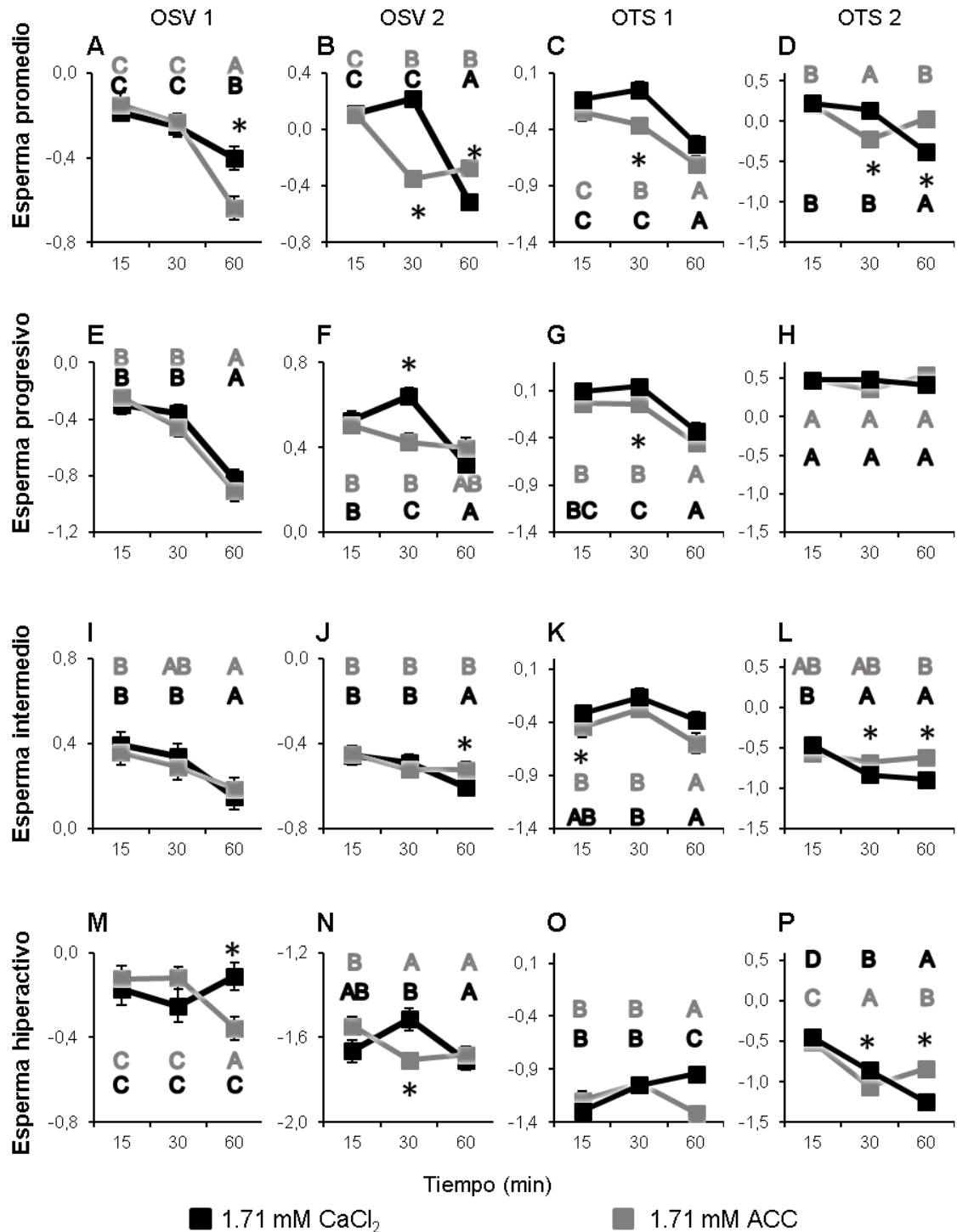
■ 1.71 mM CaCl<sub>2</sub> □ 0 mM CaCl<sub>2</sub> ▨ 0.8 mM ACC ▩ 1.2 mM ACC ▒ 1.71 mM ACC

**Figura 5.7.** Promedio de los componentes principales de la velocidad (OSV1, OSV2) y de la trayectoria (OTS1, OTS2), para el conjunto de espermatozoides (A-D), progresivos (E-H), intermedios (I-L) e HA (M-P), incubados a los 15, 30 y 60 minutos en medio CAP 1.71 mM de CaCl<sub>2</sub> sin calcio o a distintas concentraciones de carbonato cálcico amorfo (ACC). Se representan las medias ± SEM. Nótese que por mantener un equilibrio de tamaño, las figuras no están a escala (véase la gradación del eje de ordenadas).

Para realizar una comparación exhaustiva entre las 2 fuentes de calcio, consideramos describir en detalle las diferencias entre ellas a la misma concentración (1.71 mM) (**Fig. 5.8**): Ambas fuentes de calcio mostraron una disminución progresiva de los cuatro componentes, en todas las clases espermáticas, a lo largo de la incubación. Esta disminución fue significativa en el caso de OSV1 a los 60 min, tanto en el conjunto de los espermatozoides, como en los HA (**Fig. 5.8 A, M**), sin registrarse diferencias en los progresivos o intermedios (**Fig. 5.8 E, I**).

En las muestras con CaCl<sub>2</sub>, OTS1 se mantuvo constante durante los primeros 30 min, y luego disminuyó significativamente, tanto en el conjunto de los espermatozoides, como en los progresivos (**Fig. 5.8 C, G**). En el caso de los HA, se observó un incremento de OTS2 a los 60 min (**Fig. 5.8 O**). En las muestras con ACC, se observó una disminución de OTS1 al final de la incubación, en todas las clases espermáticas (**Fig. 5.8 C, G, K y O**). Las muestras con ACC tuvieron valores de OTS1 inferiores a los del control, con diferencias significativas a los 30 min en el conjunto de espermatozoides y en los progresivos (**Fig. 5.8 C, G**), así como al final de la incubación en el caso de los HA (**Fig. 5.8 O**).

En el conjunto de los espermatozoides, los valores de OTS2 de CAPc fueron constantes durante los 30 primeros min, con una disminución significativa al final de la incubación (**Fig. 5.8 D**). En la muestra con ACC se observó una disminución a los 30 min, y un posterior incremento hasta los valores iniciales al final de la incubación, mostrando, por tanto, valores estadísticamente inferiores al control a los 30 min, y significativamente superiores a los 60 min. En el caso de los espermatozoides progresivos, no se observaron variaciones a lo largo del tiempo, ni entre cada fuente de calcio (**Fig. 5.8 H**). En los intermedios, la muestra control, tuvo valores de OTS2 inferiores a los de la muestra con ACC, a partir de los 30 min de la incubación (**Fig. 5.8 L**). En los HA, la muestra control, manifestó una disminución significativa de OTS2 en cada tiempo experimental, mientras que la muestra con ACC tuvo una disminución a los 30 min, hasta valores estadísticamente inferiores a los de la muestra control, con un incremento significativo al final de la incubación (**Fig. 5.8 P**).



**Figura 5.8.** Valor promedio de los componentes principales de la velocidad (OSV1, OSV2) y de la trayectoria (OTS1, OTS2), para el conjunto de espermatozoides (A-D), progresivos (E-H), intermedios (I-L) e HA (M-P), incubados a los 15, 30 y 60 minutos en medio CAP con 1.71 mM de CaCl<sub>2</sub> (negro) o de carbonato cálcico amorfo (ACC) (gris). Se representan las medias ± SEM. Las diferencias significativas (p ≤ 0.05) respecto al control (1.71 mM CaCl<sub>2</sub>), se indican mediante un asterisco. Las letras indican diferencias significativas (p ≤ 0.05) de la muestra a lo largo del tiempo. Nótese que por mantener un equilibrio de tamaño, las figuras no están a escala (véase la gradación del eje de ordenadas).

## 6. EFECTOS DEL ZINC EN LA FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA

---

### 6.1. Antecedentes

Diversas y recientes publicaciones han puesto de manifiesto la importancia del zinc en la fertilidad masculina humana. Estos estudios, basados en la biodisponibilidad del zinc incorporado en la dieta, o en su presencia en el líquido seminal, indican que este metal es necesario para ella en las concentraciones adecuadas (Arver y Sjöberg, 1982; Sørensen *et al.*, 1999; Colagar *et al.*, 2009; Giacone *et al.*, 2016).

Se ha descrito la existencia de diversos tipos de agrupaciones espermáticas, que son clasificadas como (1) “clústeres” o agrupaciones de espermatozoides no móviles, (2) agregaciones de espermatozoides móviles, y (3) agrupaciones progresivas o *trenes* espermáticos (Tourmente *et al.*, 2016). En el caso de los *trenes*, los espermatozoides se alinean por la cabeza y muestran coordinación en el batido flagelar, permitiendo que toda la agregación muestre un movimiento progresivo (Moore *et al.*, 2002; Immler *et al.*, 2007; Tourmente *et al.*, 2016). Se ha sugerido que los eventos de agrupación espermática están relacionados con la competición espermática (Firman y Simmons, 2009; Šandera *et al.*, 2013), en los que el gancho sería imprescindible para la formación de dichas agrupaciones (Immler *et al.*, 2007), no obstante, recientes publicaciones confirman la relación con la competición espermática, así como la no implicación del gancho en la formación de *trenes* (Gómez Montoto *et al.*, 2011; Firman *et al.*, 2013; Tourmente *et al.*, 2016; Varea-Sánchez *et al.*, 2016).

El objetivo principal del presente capítulo es determinar el papel del zinc en la funcionalidad espermática de los espermatozoides de ratón, considerando la movilidad, hiperactivación y capacitación como variables de estudio. Además, debido al papel de este metal en la agregación celular, y la relación entre la formación de *trenes* espermáticos y la fertilidad (Tourmente *et al.*, 2016), se pretende estudiar el papel del zinc con los procesos de formación de agregados espermáticos.

## 6.2. Metodología particular

Se aplicó la metodología general de la tesis. Los medios de incubación espermática TYH y MT-H no incluyen zinc, pero considerando las altas concentraciones de zinc en el líquido seminal, se decidió hacer un lavado espermático para eliminar el zinc residual del epidídimo. Las distintas condiciones experimentales se realizaron según lo descrito en la **tabla 5.1**.

Se desarrollaron dos series experimentales con un total de 12 ratones CD-1:

- En la primera serie, se examinaron los efectos de diversas concentraciones de zinc y/o del quelante de Zinc, TPEN, sobre los distintos parámetros espermáticos estudiados en esta tesis, empleando para ello 6 ratones de manera independiente (sin realización de *pool* espermático).
- En la segunda serie experimental, se trabajó únicamente con los tratamientos de zinc y TPEN de interés, en base a lo obtenido en la primera serie experimental. También se examinó el efecto de añadir al medio de cultivo el zinc y el TPEN antes que la suspensión espermática (co-incubación), y el efecto de añadir TPEN tras 10 min de incubación de la suspensión espermática con zinc (post-tratamiento de TPEN).

**Tabla 5.1:** Diseño experimental asociado al capítulo 5.

SERIE 1		N = 6 RATONES													
Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Zinc ( $\mu\text{M}$ )	1	10	50	100	500	0	0	0	0	10	10	50	50	100	100
TPEN ( $\mu\text{M}$ )	0	0	0	0	0	10	50	100	500	10	50	50	100	100	500
										(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)

SERIE 2		N = 6 RATONES											
Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Zinc ( $\mu\text{M}$ )	0	10	50	0	0	10	10	50	50	EtOH			
TPEN ( $\mu\text{M}$ )	0	0	0	10	50	10	50	50	100				
										(1)	(1)	(2)	(2)

Cada columna representa una muestra diferente realizada tanto en medio NC como en medio CAP. Debido a que el TPEN está diluido en etanol, se incubó una alícuota de suspensión espermática en cada medio de cultivo con etanol, para verificar que las diferencias se debían al TPEN y no al etanol (columna 10 de Serie 2). Todas las concentraciones vienen indicadas en micromolar. (1) Co-tratamiento: zinc y TPEN elementos añadidos al medio antes de la incubación. (2) Post-tratamiento: TPEN añadido al medio tras 10 min de incubación en medio con zinc.

### 6.3. Resultados

#### 6.3.1. Efectos generales sobre la calidad espermática

Las observaciones microscópicas revelaron la presencia de cristales de cloruro de zinc, de manera proporcional a la concentración del metal durante las incubaciones. Los espermatozoides se adherían a esos cristales por la cabeza, generando grandes agrupaciones espermáticas artificiales y no progresivas, formadas por espermatozoides móviles. Además, concentraciones elevadas de zinc o de TPEN en el medio de cultivo, ocasionaron la aparición de agregaciones espermáticas y de espermatozoides agrupados entre sí, lo que, junto con la presencia de cristales, dificultó el análisis de la cinética espermática. En las muestras incubadas en medio NC con concentraciones de zinc superiores a los 100  $\mu\text{M}$ , los cristales de zinc ocasionaron la precipitación de los espermatozoides, mientras que, en medio CAP, dicha precipitación ocurrió con concentraciones superiores a los 50  $\mu\text{M}$ .

Debido a la formación de agrupaciones no progresivas de espermatozoides móviles y a su precipitación, las concentraciones de zinc superiores a 100  $\mu\text{M}$  no pudieron ser analizadas mediante el software de análisis, siendo descartadas de la segunda serie experimental. También se excluyeron las muestras con concentraciones de zinc inferiores a 10  $\mu\text{M}$ , al no existir en ellas diferencias respecto al control en ninguno de los parámetros de estudio.

Las observaciones microscópicas, y mediante software de análisis microscópicos, no revelaron que el diluyente del TPEN, es decir, el etanol, causara diferencias respecto al control en ninguno de los medios de cultivo.

#### 6.3.2. Efectos del zinc en la movilidad espermática

El porcentaje de espermatozoides móviles y el de espermatozoides vigorosos no varió con el tiempo en ninguno de los controles (NCc ni CAPc) (tabla S4.1.)

En condiciones de supervivencia, el porcentaje de espermatozoides individuales móviles disminuyó de manera proporcional al incremento en la concentración de zinc (**Fig. 6.1 A**). En las muestras con zinc y aquellas con 100  $\mu\text{M}$  de TPEN, este

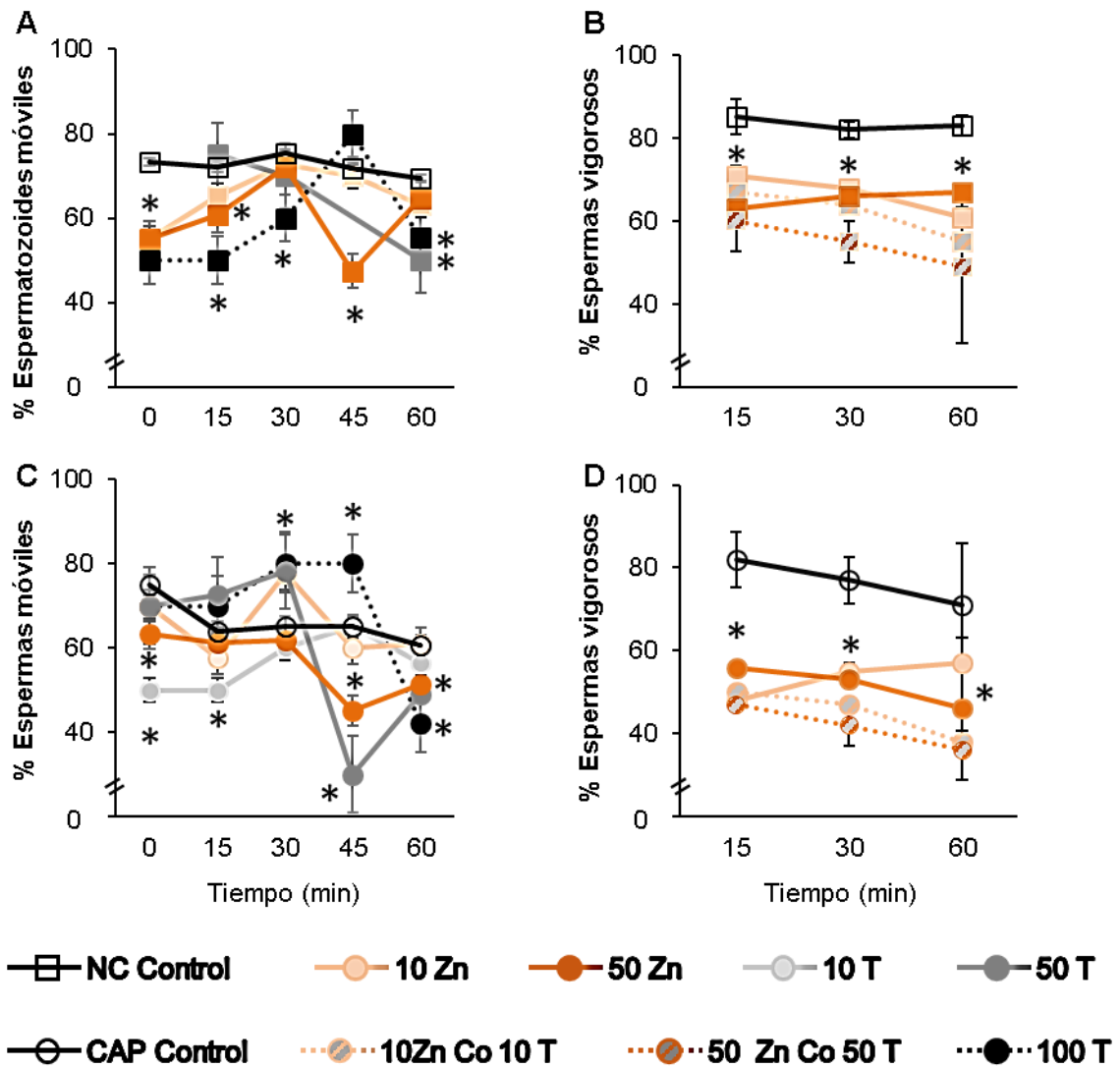


porcentaje fue significativamente inferior al del control NC desde el inicio de la incubación, y fue aumentando a lo largo de ésta.

El porcentaje de espermatozoides vigorosos fue significativamente inferior en las muestras con zinc y/o TPEN respecto a NCc (**Fig. 6.1 B**). Este porcentaje fue menor en las muestras en las que ambos elementos fueron añadidos al medio antes que la suspensión espermática (co-tratamiento).

En condiciones capacitantes, todas las muestras incubadas con zinc o TPEN, tuvieron significativamente menos espermatozoides móviles que el control al inicio de la incubación (**Fig. 6.1 C**). La muestra con 10  $\mu\text{M}$  de zinc, presentó valores similares a los de CAPc durante toda la incubación, con la excepción de los 30 min, en los que tuvo significativamente más espermatozoides móviles. La muestra con 50  $\mu\text{M}$  de zinc, tuvo valores similares a los del control a los 15 y 30 min de incubación, pero manifestó una disminución significativa a partir de los 45 min. La muestra con 10  $\mu\text{M}$  TPEN, tuvo un porcentaje de espermatozoides móviles significativamente inferior al del resto de las muestras antes de los 30 min de incubación, tiempo a partir del cual dio valores similares a los de CAPc. La muestra con 50  $\mu\text{M}$  de TPEN, presentó valores significativamente superiores a los del control entre los 15 y 30 min de incubación. Además, a partir de los 45 min, su porcentaje de espermatozoides móviles fue significativamente inferior al de CAPc y al de la mayoría de los otros tratamientos. La muestra con 100  $\mu\text{M}$  de TPEN, presentó valores significativamente superiores a los del control a los 45 min de la incubación. Al final de esta, sus valores fueron significativamente inferiores a los del resto de las muestras. Los tratamientos con concentraciones de TPEN superiores a los 50  $\mu\text{M}$ , mostraron espermatozoides agregados y con menor movilidad en ambos medios.

El porcentaje de espermatozoides vigorosos fue significativamente inferior en todas las muestras respecto a CAPc (**Fig. 6.1 D**). La muestra con 10  $\mu\text{M}$  de zinc manifestó un incremento de espermatozoides vigorosos a lo largo de la incubación, mientras que el resto de las muestras el efecto fue el contrario. Consultar tabla S4.2. para más información.



**Figura 6.1:** Porcentaje de espermatozoides móviles (izquierda) y vigorosos (derecha) durante la incubación en condiciones NC (cuadrado) o CAP (círculo), en concentraciones crecientes de zinc (Zn) o TPEN (T). Controles y tratamientos en NC (A, B), o en CAP (C, D). Los gráficos muestran el promedio  $\pm$  S.E.M. Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) respecto al control, se indican con un asterisco. Las concentraciones están indicadas en micromolar.

### 6.3.3. Efectos del zinc sobre la agregación de espermatozoides

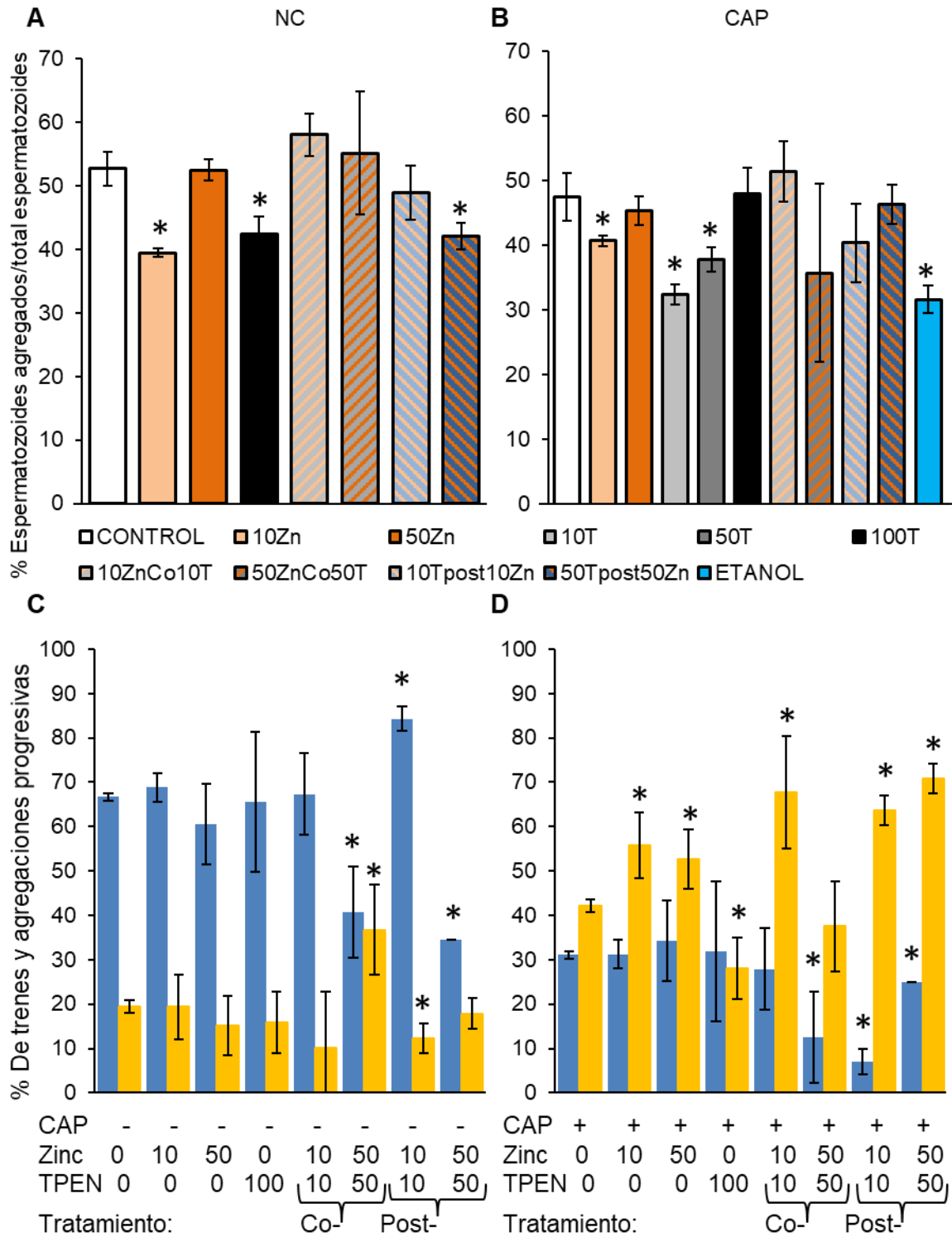
En este apartado se describen las diferencias encontradas entre los espermatozoides móviles individuales, las agregaciones progresivas (*trenes*) y las no progresivas. Las agrupaciones de espermatozoides en torno a cristales de zinc no fueron consideradas en el presente conjunto de resultados. Ver las tablas S4.3 y S4.4 del anexo 3 para consultar los datos numéricos.

A los 60 min de incubación en medio NC, el porcentaje de espermatozoides formando agregados fue significativamente inferior a la del control en las muestras con 10  $\mu\text{M}$  de zinc, en aquellas con 100  $\mu\text{M}$  de TPEN y en el post-tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de zinc y TPEN (**Fig. 6.2 A**). El resto de las muestras no presentaron diferencias significativas respecto a NCc.

En el medio CAP, la respuesta fue similar a la observada en NC (**Fig. 6.2 B**). Ningún tratamiento presentó mayor porcentaje de espermatozoides formando agregados que el control, y las muestras con 10  $\mu\text{M}$  de zinc, con 10 y 50  $\mu\text{M}$  de TPEN, y aquella con etanol, presentaron significativamente menos espermatozoides formando agregados que CAPc.

El porcentaje de agrupaciones progresivas y *trenes* del total de agrupaciones en condiciones de supervivencia varió respecto al control únicamente en los co-tratamientos y post-tratamientos: Del total de agrupaciones, el 66.74 % fueron *trenes* y el 19.52 % agrupaciones progresivas en el caso del control. El porcentaje de *trenes* fue significativamente inferior a NCc en el co-tratamiento (40.75%) y post-tratamiento (34.52%) con 50  $\mu\text{M}$  de zinc y TPEN, y significativamente superior en el post-tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  de zinc y TPEN (84.30%) (**Fig. 6.2 C**). A su vez, el porcentaje de agrupaciones progresivas del total de agrupaciones fue significativamente inferior a NCc (19.52 %) en el post-tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  de zinc y TPEN (12.36%), y estadísticamente superior en el co-tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de zinc y TPEN (36.75%).

En condiciones capacitantes, el porcentaje de agrupaciones progresivas y *trenes* del total de agrupaciones varió respecto al control en la mayoría de los tratamientos: Del total de agrupaciones, el 31.04 % fueron *trenes* y el 42.13 % agrupaciones progresivas en el caso del control. El porcentaje de *trenes* fue significativamente inferior en el co-tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de zinc y TPEN y en ambos post-tratamientos (12.5, 6.98 y 25 % respectivamente) (**Fig. 6.2 D**). El porcentaje de agrupaciones progresivas del total de agrupaciones fue significativamente inferior a CAPc en la muestra con 100  $\mu\text{M}$  de TPEN, presentando el resto de los tratamientos valores estadísticamente superiores al control (con la excepción del co-tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de zinc y TPEN, que no tuvo diferencias significativas respecto al control).



**Figura 6.2:** Porcentaje de espermatozoides formando agrupaciones tras 60 min de incubación en medio NC (A) o CAP (B) en presencia de distintas concentraciones de zinc o TPEN. Porcentaje de espermatozoides formando *trenes* (azul) o agrupaciones no progresivas (amarillo), del total de espermatozoides agregados, a los 60 min de incubación en medio NC (C) o CAP (D). Se muestra promedio  $\pm$  S.E.M. Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) respecto al control se indican mediante asteriscos. Todas las concentraciones están indicadas en micromolar. Nótese que por mantener un equilibrio de tamaño, las figuras no están a escala (véase la gradación del eje de ordenadas).

#### 6.3.4. Efectos sobre la clasificación de los espermatozoides

En condiciones de supervivencia, los tratamientos no ocasionaron diferencias respecto a NCc en el porcentaje de espermatozoides progresivos a lo largo de la incubación (**Fig. 6.3 A, 6.4 A**). Además, tuvieron un porcentaje de espermatozoides intermedios similar al de NCc al inicio de la incubación (**Fig. 6.3 B**), pero con valores significativamente inferiores al final de esta (**Fig. 6.4 B**). La única excepción fue el post-tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  de zinc y TPEN, que mostró valores significativamente superiores al resto de las muestras. El co-tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de zinc y TPEN, fue el que menos espermatozoides intermedios reveló. La muestra co-incubada con 50  $\mu\text{M}$  de zinc y TPEN, presentó significativamente más espermatozoides HA que el resto de las muestras al inicio de la incubación (**Fig. 6.3 C**). Al final de ésta, todas las muestras tuvieron un porcentaje de HA similar a NCc, con la excepción de los co-tratamientos y post-tratamientos con 50  $\mu\text{M}$  de zinc y TPEN, que exhibieron valores estadísticamente superiores al control (**Fig. 6.4 C**).

En condiciones capacitantes, todos los tratamientos mostraron significativamente más progresivos (**Fig. 6.3 B y Fig. 6.4 A**), y estadísticamente menos HA (**Fig. 6.3 F y Fig. 6.4 C**) que CAPc, a lo largo de la incubación.

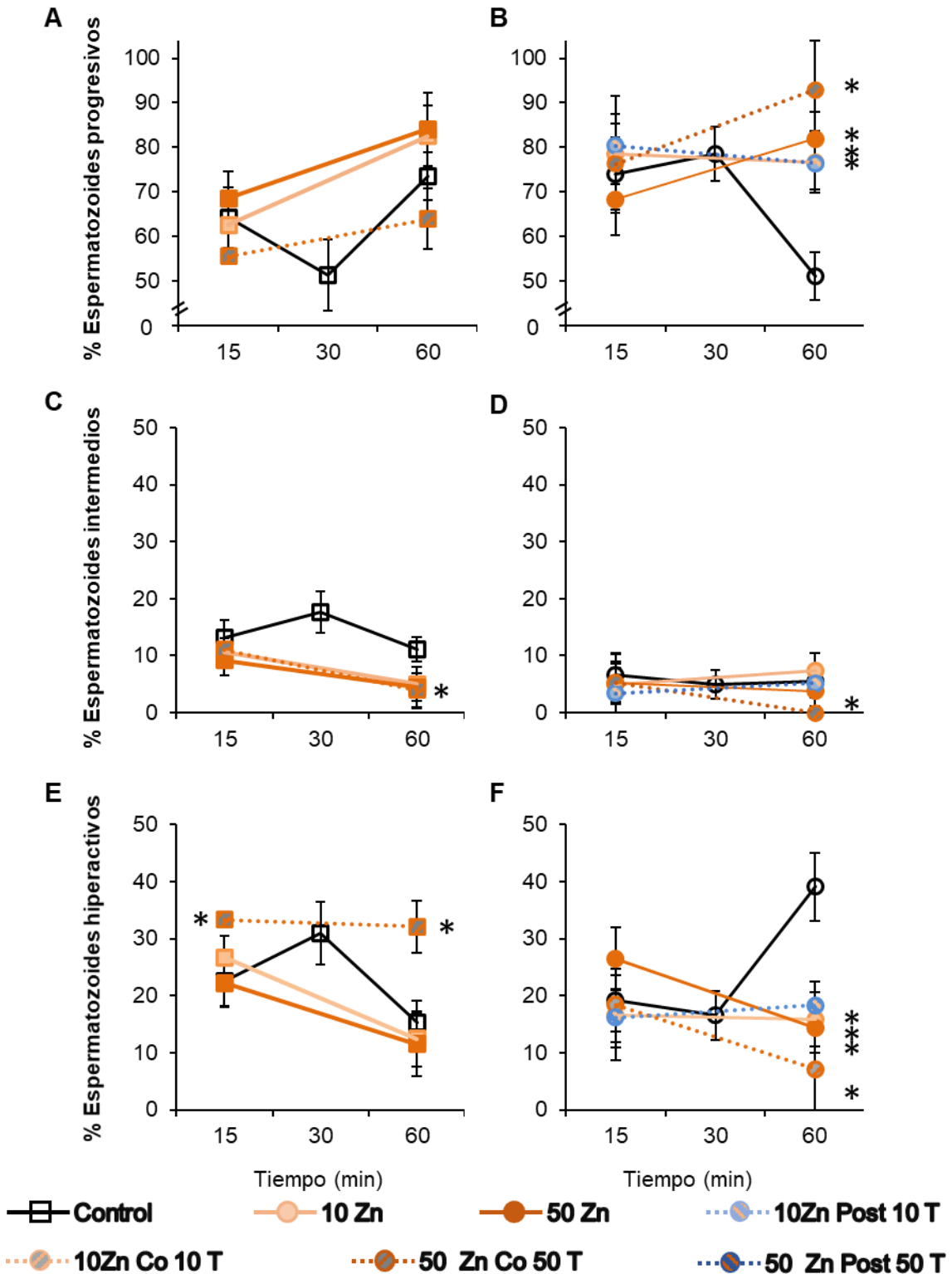
Todos estos resultados manifiestan una dispersión por encima de lo deseado, ya que se ven afectados por la presencia de cristales de zinc y agregaciones espermáticas en el medio. Consultar tabla S4.5.

### 6.3.5. Efectos sobre la señalización espermática del proceso de la capacitación

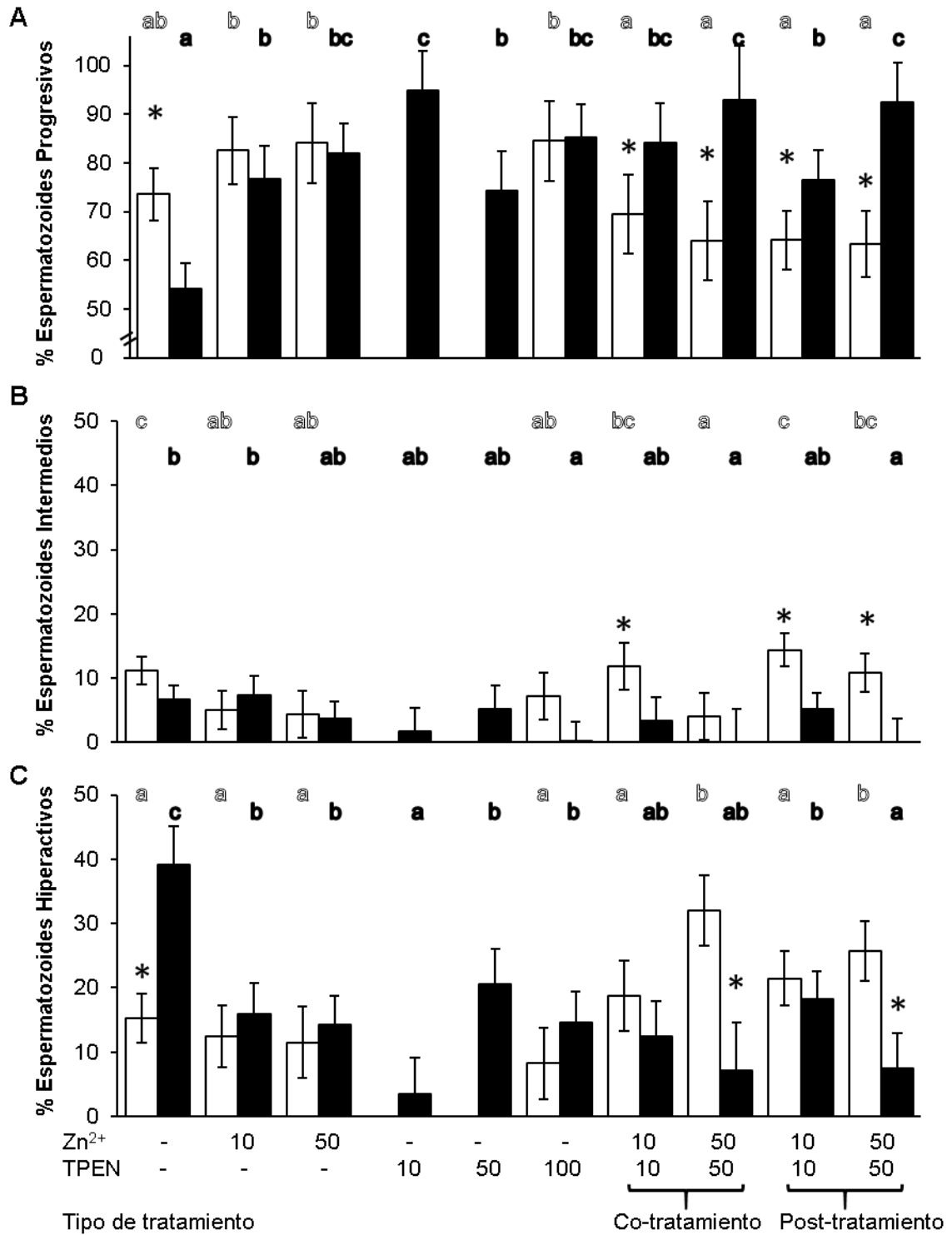
Ninguno de los tratamientos causó diferencias en el patrón de fosforilación de pPKA (**Fig. 6.5 A**) ni de pY (**Fig. 6.5 B**). En condiciones de supervivencia, la intensidad de la señal de pPKA aumentó significativamente respecto a NCc en todas las muestras, con la excepción de aquella con 50  $\mu\text{M}$  de TPEN (**Fig. 6.5 C**). El co-tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de zinc y TPEN, mostró los mayores valores de pPKA. La intensidad relativa de pY aumentó significativamente respecto a NCc, en las muestras con 10 y 100  $\mu\text{M}$  de zinc, en el co-tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  de zinc y TPEN y en el post-tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de zinc y TPEN (**Fig. 6.5 D**).

En condiciones capacitantes, la intensidad relativa de pPKA disminuyó significativamente respecto al control en ambos co-tratamientos, y aumentó de manera significativa en las muestras incubadas con 50  $\mu\text{M}$  de zinc y en aquellas con 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de TPEN, siendo superior el aumento en aquellas con mayor concentración del quelante (**Fig. 6.5 C**). La intensidad de la señal de pY disminuyó significativamente respecto a CAPc en las muestras con 1 y 10  $\mu\text{M}$  de zinc, y en el co-tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  de zinc y TPEN. Esta señal tuvo un incremento significativo respecto al control y al resto de las muestras, al incubar con 50  $\mu\text{M}$  de zinc, en el co-tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de zinc y TPEN, y en el post-tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  de zinc y TPEN (**Fig. 6.5 D**).

Los datos numéricos de la intensidad relativa de la señal de pPKA y pY se encuentran en la tabla S4.6.

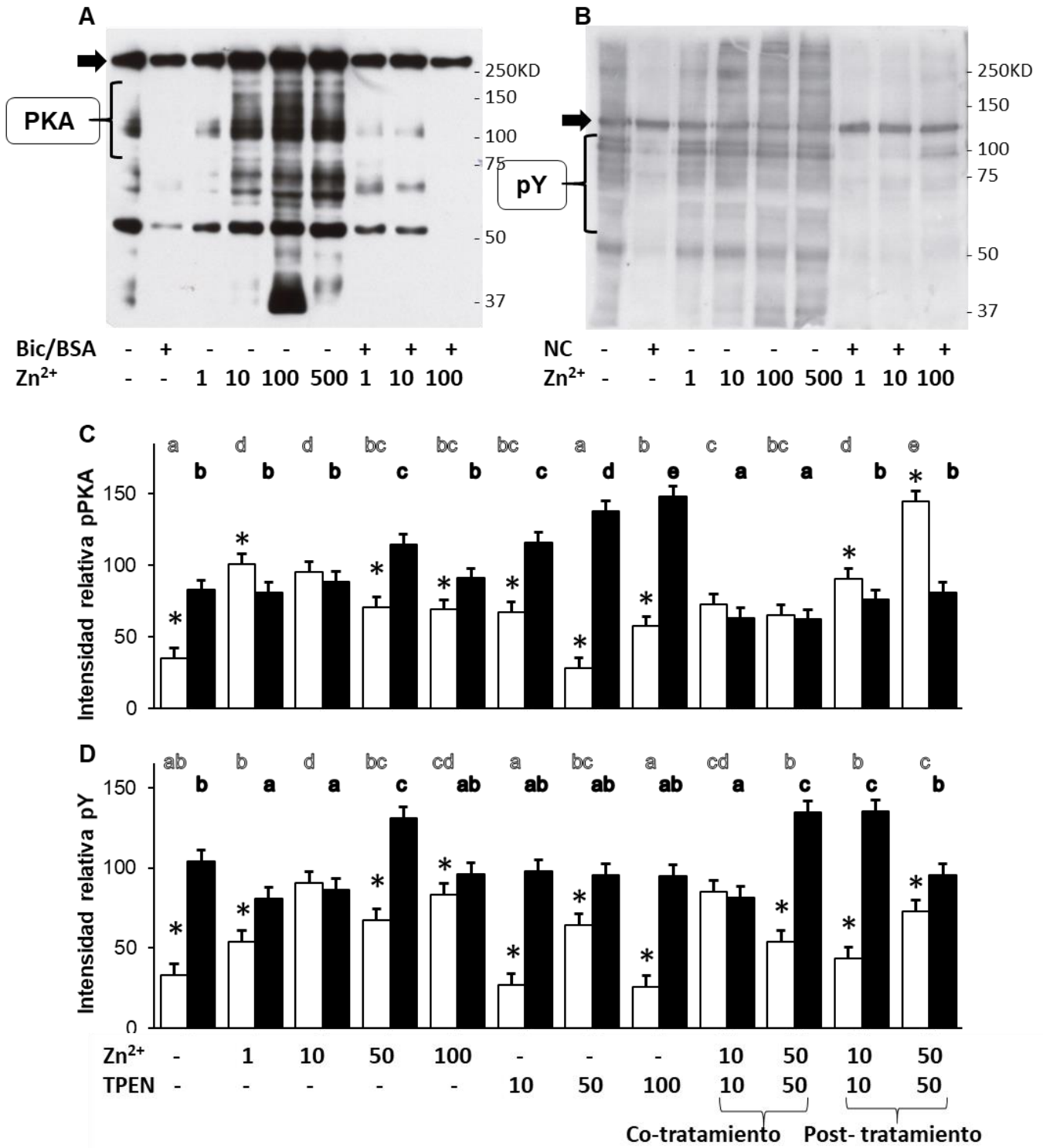


**Figura 6.3.** Variaciones en el porcentaje de cada clase espermática de la categoría vigorosos: progresivos (A – B), intermedios (C – D) e hiperactivos (E – F). Muestras incubadas durante 60 min en medio NC (izquierda, cuadrados) o CAP (derecha, círculo), con distintas condiciones de zinc o TPEN. Los gráficos muestran el promedio  $\pm$  S.E.M. Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) respecto al control, se indican con un asterisco. Las concentraciones están indicadas en micromolar. Nótese que por mantener un equilibrio de tamaño, las figuras no están a escala (véase la gradación del eje de ordenadas).



**Figura 6.4:** Variaciones en el porcentaje de cada clase espermática a los 60 min de incubación. Espermatozoides progresivos (A), intermedios (B) e hiperactivos (C). Se muestran promedios  $\pm$  S.E.M. Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos están indicadas por letras (negrita = NC, simple = CAP), y aquellas entre medios, mediante asteriscos. Medio NC: barras blancas. Medio CAP: barras negras. Zn<sup>+2</sup> = zinc. Las concentraciones están indicadas en micromolar. Nótese que por mantener un equilibrio de tamaño, las figuras no están a escala (véase la gradación del eje de ordenadas).





**Figura 6.5:** Efectos del zinc (Zn<sup>2+</sup>) sobre el patrón de fosforilación de proteínas de la capacitación. *Blots* de proteínas fosforiladas por PKA (pPKA) (A) y en residuos de tirosina (pY) (C). La intensidad relativa de la señal de las bandas englobadas por la llave fue obtenida por densitometría, normalizando mediante el control de carga (indicado por una flecha). En las gráficas se representan los promedios ± S.E.M de la señal de pPKA (B) y de pY (D) de todas las condiciones experimentales. Medios NC (blanco) y CAP (negro). Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre muestras están indicadas por letras (“negrita” =NC, simple =CAP), y aquellas entre medios por asteriscos. Zn<sup>2+</sup> = zinc. Las concentraciones están indicadas en micromolar.

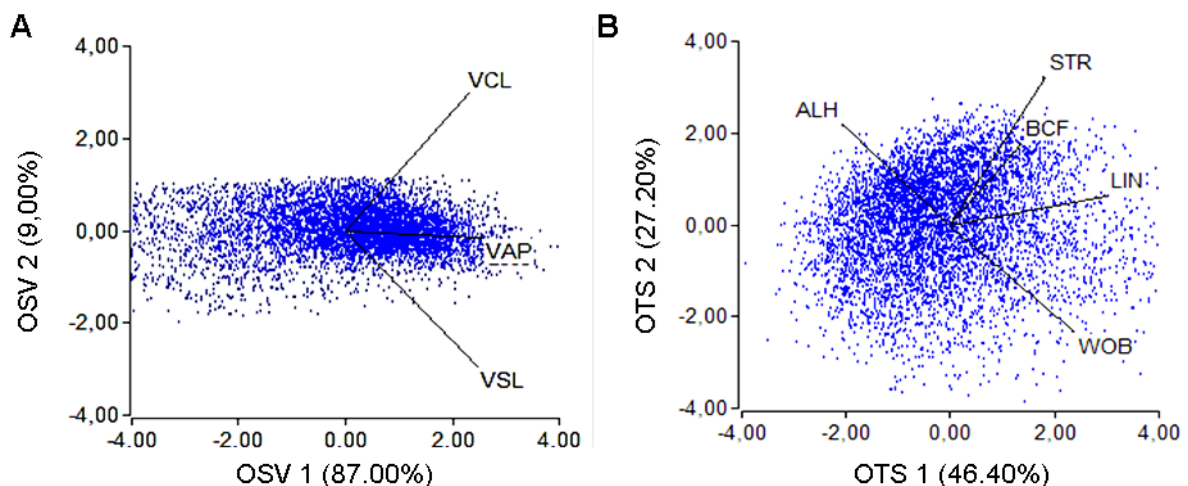
**6.3.6. Efectos sobre la cinética espermática**

Se analizaron los datos de los 8 parámetros de la cinética espermática generados por el sistema CASAnova para los espermatozoides individuales identificados como vigorosos (Tablas S4.7 y S4.8). Estos datos se procesaron mediante dos Análisis de Componentes Principales (PCA), efectuado tanto en los parámetros de velocidad como de trayectoria. Un resumen de sendos análisis se encuentran la **tabla 6.2** y en la **figura 6.6**:

**Tabla 6.2:** Contribución de cada parámetro de la cinética espermática a cada componente principal (PC).

Componente principal	OSV 1		OSV 2		OTS 1		OTS 2	
	Autovector	R	Autovector	R	Autovector	R	Autovector	R
<b>VAP</b>	0.59	<b>0.96</b>	-0.04	-0.02	NA	NA	NA	NA
<b>VSL</b>	0.57	<b>0.92</b>	-0.69	<b>-0.36</b>	NA	NA	NA	NA
<b>VCL</b>	0.57	<b>0.92</b>	0.73	<b>0.38</b>	NA	NA	NA	NA
<b>ALH</b>	NA	NA	NA	NA	-0,42	<b>-0,64</b>	0,44	<b>0,52</b>
<b>BCF</b>	NA	NA	NA	NA	0,28	<b>0,42</b>	0,36	<b>0,42</b>
<b>STR</b>	NA	NA	NA	NA	0,37	<b>0,56</b>	0,66	<b>0,76</b>
<b>LIN</b>	NA	NA	NA	NA	0,61	<b>0,93</b>	0,13	<b>0,15</b>
<b>WOB</b>	NA	NA	NA	NA	0,49	<b>0,74</b>	-0,48	<b>-0,56</b>
<b>Autovalor:</b>	87.00 %		9.00 %		46.40 %		27.20 %	

Se indica el coeficiente de correlación de cada parámetro con su PC mediante la R de Pearson. En negrita, aquellas con correlación significativa ( $p \leq 0.05$ ). El autovalor indica cuánto contribuye ese componente a la explicación de las variaciones observadas.



**Figura 6.6.** Análisis de componentes principales en donde se indica la contribución de cada parámetro de la cinética espermática a cada componente principal (PC). Gráfico de componentes principales de velocidad (OSV1 y OSV2) (A) y de la trayectoria (OTS1 y OTS2) (B).

Siguiendo la definición de "trayectoria", "recorrido" y "desplazamiento" del bloque de resultados anterior (Capítulo 2), los distintos CP pueden ser descritos de la siguiente manera:

OSV1 explica las diferencias encontradas en los parámetros de velocidad de los espermatozoides (87.00 %). Debido a que OSV2 explica menos del 10% de las variaciones detectadas para los parámetros de la velocidad, no será tenido en cuenta en la descripción de sus variaciones.

OST1 explica el 46.40% de las diferencias encontradas en la trayectoria, aumenta cuando los espermatozoides presentan trayectorias más lineales y menos oscilantes.

OTS2 explica el 27.20% de las diferencias encontradas en la trayectoria de los espermatozoides, y aumenta cuando los espermatozoides presentan trayectorias con movimientos laterales más amplios.

Debido a la dificultad de ejecutar este análisis por la presencia de cristales de zinc en el medio, y por la cantidad de agrupaciones de espermatozoides, se evaluó únicamente al final de la incubación, al ser este los 60 min el momento más importante para la fecundación de los espermatozoides.

#### **6.3.6.1. Efectos del zinc sobre la velocidad espermática**

A los 60 min de incubación en condiciones capacitantes, todas las muestras tuvieron valores significativamente menores de OSV1 que NCc, en los espermatozoides progresivos e hiperactivos, con la excepción del post-tratamiento con 50  $\mu$ M de zinc, que presentó valores estadísticamente más altos que el NCc (**Fig. 6.7 A, C**). En los espermatozoides progresivos, las muestras con 100  $\mu$ M de TPEN, seguidas del co-tratamiento con 50  $\mu$ M de zinc, y del post-tratamiento con 10  $\mu$ M de zinc, fueron las que menores valores de OSV1 tuvieron (**Fig. 6.7 A**). En el caso de los intermedios, el co-tratamiento con 50  $\mu$ M de zinc y TPEN fue la única muestra significativamente más lenta que el control (**Fig. 6.7 B**), mientras que las muestras con 50  $\mu$ M de zinc y el post-tratamiento con 50  $\mu$ M de zinc, fueron estadísticamente más rápidas que el resto de ellas (**Fig. 6.7 B**). Consultar también la tabla S4.9 del anexo 3.

A los 60 min de incubación en medio CAP, al contrario que en condiciones de supervivencia, la mayoría de las muestras tuvieron valores de OSV1 estadísticamente más altos que el control. En los espermatozoides progresivos, la muestra con 50  $\mu$ M de TPEN, y aquella de 50  $\mu$ M de zinc, presentaron valores de OSV1 significativamente inferiores al resto de las muestras (**Fig. 6.7 A**). Las muestras con 10  $\mu$ M de zinc, seguida de aquella con 10  $\mu$ M de TPEN, el co-tratamiento con 10  $\mu$ M de zinc y TPEN y la muestra con 100  $\mu$ M de TPEN, tuvieron valores de OSV1 estadísticamente más grandes que el resto.

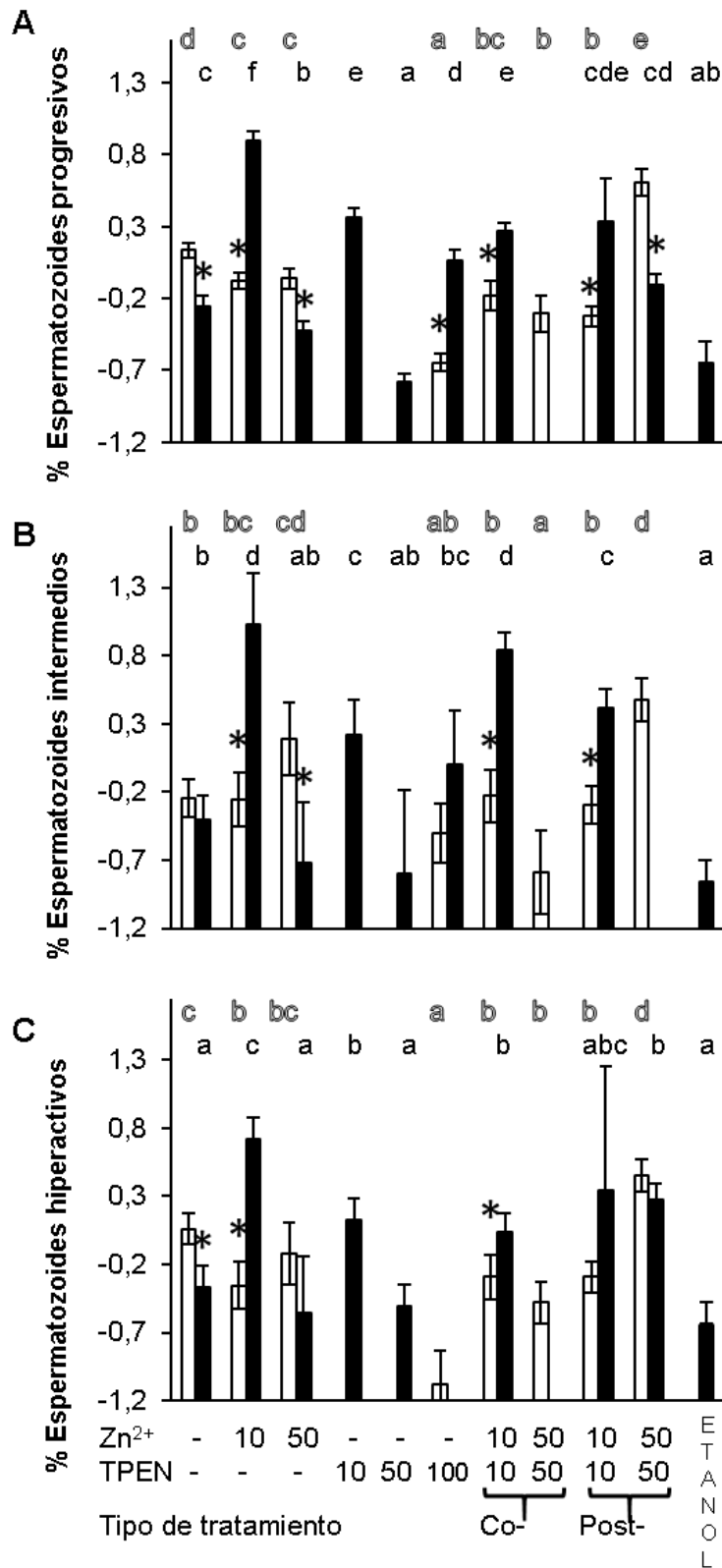
En el caso de los intermedios, las muestras con mayor OSV1 fueron aquellas incubadas con 10  $\mu$ M de zinc, seguida del co-tratamiento y del post-tratamiento con 10  $\mu$ M de zinc y TPEN, y de la muestra con 10  $\mu$ M TPEN, el resto de los tratamientos mostraron valores similares a los del control (**Fig. 6.7 B**).

En el caso de los hiperactivos, los OSV1 de las muestras con 10  $\mu$ M de zinc, seguida de aquella con 10  $\mu$ M de TPEN, los co-tratamientos y post-tratamientos fueron estadísticamente más altos que el resto de las muestras, que no presentaron diferencias respecto al control (**Fig. 6.7 C**).

#### **6.3.6.2. Efectos del zinc sobre la trayectoria espermática**

A los 60 min de incubación en medio NC, la mayoría de las muestras tuvieron valores de ambos componentes de la trayectoria, inferiores a los del control (**Fig. 6.8**, tabla S4.9). En el caso de los espermatozoides progresivos e hiperactivos, todas las muestras presentaron valores de OTS1 significativamente inferiores a los de NCc, con la excepción del post-tratamiento con 50  $\mu$ M de zinc y TPEN, que manifestó valores de OTS1 significativamente más altos al resto de las muestras (**Fig. 6.8 A, C**). En el caso de los intermedios, únicamente el post-tratamiento con 50  $\mu$ M de zinc y TPEN presentó valores de OTS1 significativamente superior a NCc y al resto de las muestras (**Fig. 6.8 B**).

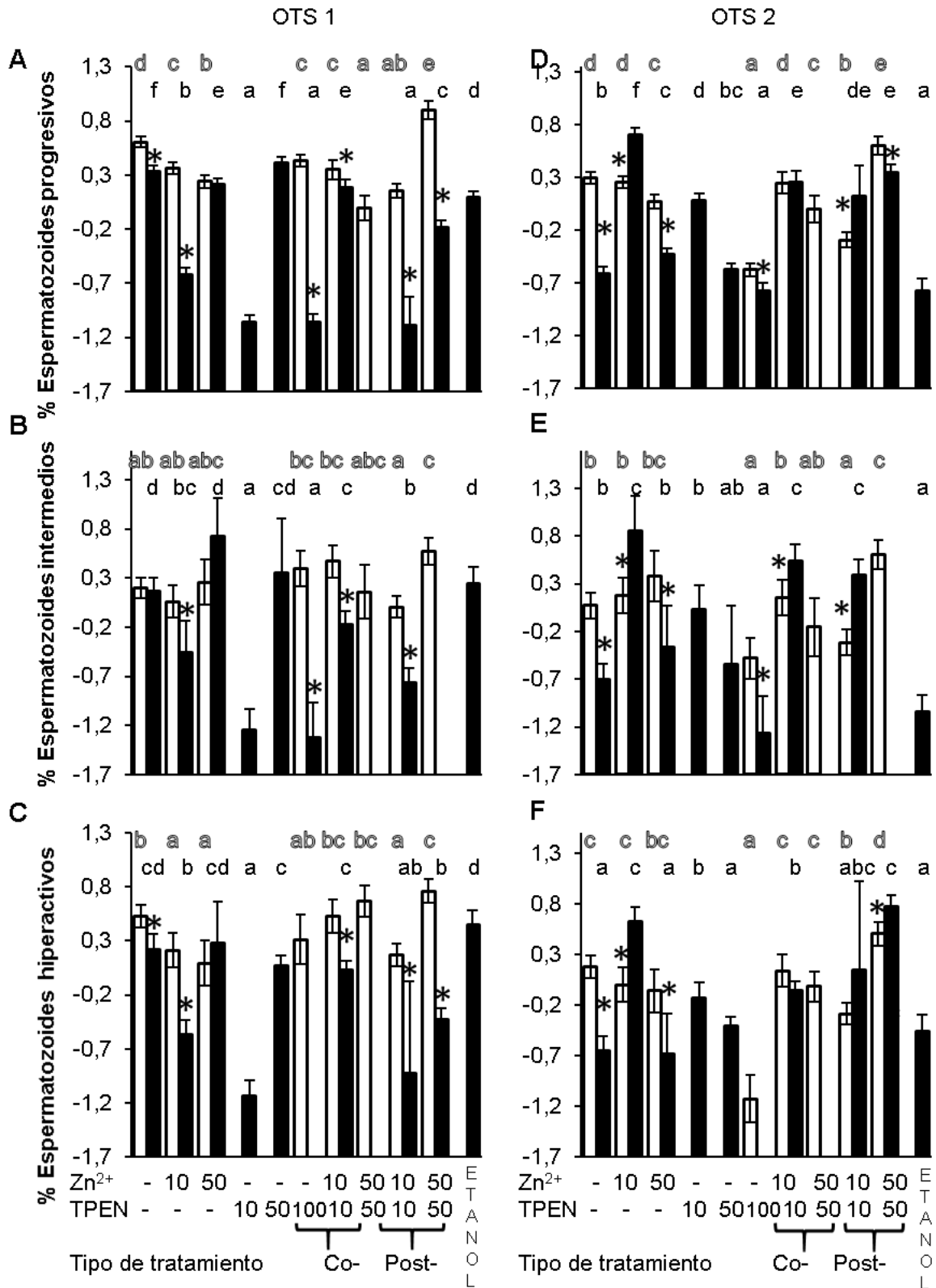
A los 60 min de incubación en medio CAP, todas las muestras, a excepción de aquella 50  $\mu$ M de TPEN, tuvieron valores de OTS1 significativamente inferiores a CAPc, en las tres clases espermáticas (**Fig. 6.8 A-C**). Además, las muestras con 10  $\mu$ M de zinc, 10 o 100  $\mu$ M de TPEN, y ambos post-tratamientos, manifestaron los menores valores de OTS1.



**Figura 6.7.** Variación del componente principal de la velocidad, OSV1 a los 60 min de incubación en medio NC (blanco) y CAP (negro) a distintas condiciones de zinc y TPEN. Cada variable viene descrita según la clase espermática; progresivos (A), intermedios (B) e hiperactivos (C). Se muestran promedios ± S.E.M. Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre muestras están indicadas por letras (“negrita” =NC, simple =CAP), y aquellas entre medios, mediante asteriscos. Las concentraciones están indicadas en micromolar.

En las muestras incubadas en condiciones de supervivencia, las muestras con 100  $\mu\text{M}$  de TPEN, seguida del post-tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  de zinc y TPEN, presentaron valores de OTS2 significativamente inferiores a los de NCc, y el post-tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de zinc y TPEN mostró valores estadísticamente superiores a los de NCc, en las tres clases espermáticas (**Fig. 6.8 D-F**). En los progresivos, el co-tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de zinc y TPEN, también tuvo valores de OTS2 significativamente inferiores a NCc (**Fig. 6.8 D**).

A los 60 min de incubación en medio CAP, las muestras con 10  $\mu\text{M}$  de zinc, el co-tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  de zinc y TPEN y post-tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de zinc y TPEN, presentaron los mayores valores de OTS2, mientras que aquella con 100  $\mu\text{M}$  de TPEN, presentó los menores valores de la serie (**Fig. 6.8 D-F**). En los espermatozoides progresivos, todas las muestras manifestaron valores de OTS2 estadísticamente superiores a los de CAPc (**Fig. 6.8 D**), con la excepción de la muestra con 100  $\mu\text{M}$  de TPEN, que tuvo valores significativamente inferiores, y de la muestra con 50  $\mu\text{M}$  de TPEN, que no tuvo diferencias significativas respecto a CAPc. En los intermedios, el post-tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  de zinc y TPEN mostró valores de OTS2 estadísticamente superiores a CAPc (**Fig. 6.8 E**). En los espermatozoides HA, tanto la muestra con 10  $\mu\text{M}$  de TPEN, como el post-tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de zinc y TPEN tuvieron valores de OTS2 significativamente superiores a los de CAPc (**Fig. 6.8 F**).



**Figura 6.8:** Variación de los componentes principales de la trayectoria OST1 (A-C, izquierda) y OST2 (D-F, derecha) de los espermatozoides progresivos (A, D), intermedios (B, E) e hiperactivos (C, F), a los 60 min de incubación en medios de cultivo de supervivencia (blanco) o de capacitación (negro). Los gráficos muestran el porcentaje promedio  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre muestras están indicadas por letras (blanco = NC, negro = CAP), y aquellas entre medios mediante asteriscos. Todas las concentraciones están indicadas en micromolar.

## 7. EFECTOS DE LOS RADICALES LIBRES (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Y LA CATALASA SOBRE LA FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA

---

### 7.1. Antecedentes

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son consideradas moléculas de deshecho del metabolismo aeróbico celular, empleadas por algunas células somáticas, entre otras funciones, como mensajeros de señalización de la supervivencia y la apoptosis celular (Costantini *et al.*, 2010; Costantini, 2014).

Existen discrepancias sobre la presencia, origen y función de dichas moléculas en los espermatozoides de los mamíferos: algunos autores consideran que éstas células no son capaces de producirlas, y que los ROS presentes en ellos proceden del entorno (Iwasaki y Gagnon, 1992; Plante *et al.*, 1994), como células del sistema inmune o de espermatozoides inmaduros acompañantes (revisado en Sharma y Agarwal, 1996; Doshi *et al.*, 2012). Otros autores sugieren que el ROS intraespermático ([ROS]<sub>i</sub>) tiene un origen citosólico e incluso mitocondrial (revisado en Costantini, 2014; Guerriero *et al.*, 2014).

Parte de la comunidad científica sugiere que los espermatozoides son altamente susceptibles al ataque de los ROS, que les generan daño oxidativo a nivel de la membrana, proteínas y ADN (revisado en Costantini *et al.*, 2010; Costantini, 2014). Sin embargo, otros autores consideran que pequeñas cantidades de radicales libres, intervienen en la funcionalidad espermática de algunos mamíferos (Aitken *et al.*, 1989, 1996, 1997; de Lamirande y Gagnon, 1993a), actuando como segundo mensajero regulando la movilidad, la capacitación, la HA y la RA (de Lamirande y O'Flaherty, 2008; de Lamirande *et al.*, 2009; de Lamirande y Lamothe, 2010). Según estos autores, ROS regulan estos procesos mediante la activación de la AC al inicio de la capacitación, así como mediante la inhibición de las fosfatasa que bloquean la activación espontánea de PKA (Aitken, Paterson, *et al.*, 1995; Baker *et al.*, 2006; Aitken *et al.*, 2015), en espermatozoides de diversas especies de mamíferos como humanos, cérvidos y ratones (Aitken *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 2002; Ecroyd *et al.*, 2003).



El objetivo de este capítulo es determinar la capacidad de los ROS de inducir o facilitar el proceso de la capacitación, así como su papel en la regulación de los distintos procesos de la funcionalidad espermática.

También se pretende verificar el efecto de los antioxidantes sobre la funcionalidad espermática, y determinar si su efecto es antagónico al de los ROS en los procesos de capacitación, movilidad y desarrollo de la HA. Dado que la catalasa (CAT) genera la hidrólisis del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en oxígeno y agua, y este ROS es producido de forma espontánea por las células desde el ion superóxido, y es el responsable de la mayoría de las alteraciones celulares, con el estudio de CAT se pretende abarcar el estudio del efecto de los AOs sobre la funcionalidad espermática.

## 7.2. Metodología particular

Se aplicó la metodología general de la tesis. Las distintas condiciones experimentales se realizaron según lo descrito en la **tabla 7.1**.

Se desarrollaron 8 series experimentales:

- En las 5 primeras se examinaron concentraciones de  $H_2O_2$  necesarias para causar diferencias en la funcionalidad espermática, sin ocasionar daño oxidativo (DO). En estas series, las pruebas fueron realizadas incubando los espermatozoides de cada uno de los ratones, durante 90 min, tanto en condiciones de supervivencia como capacitantes, así como en medio NC suplementado de manera alternativa con albúmina (BSA) o bicarbonato sódico, con el objetivo de determinar si los ROS son capaces de inducir la capacitación en condiciones de supervivencia, o de acelerar el proceso en condiciones capacitantes.
  - o Las series 1 y 2 fueron realizadas en los laboratorios del MNCN-CSIC sobre ratones *Mus musculus musculus* silvestres.
    - En la primera serie se determinó que concentraciones de  $H_2O_2$  superiores a 300  $\mu$ M impedían la movilidad de los espermatozoides, por lo que dichas concentraciones se descartaron de las series experimentales posteriores.

- En la serie 2, se examinó si las diferencias observadas en los experimentos de la serie 1 variaban en presencia de BSA o de bicarbonato sódico a las concentraciones propias del medio CAP (sección 3.2.1 de materiales y métodos generales).
- Las series 3 a 5 fueron realizadas en los laboratorios del Departamento de Veterinaria de la Universidad de Massachusetts empleando ratones *Mus musculus* CD-1. Se comprobó que se podían replicar los resultados obtenidos en las dos primeras series, y además se realizó el estudio del estatus proteico mediante pruebas de WB, a los 30 y 60 min, para analizar el perfil proteico de pPKA y pY, y así determinar si ocurre algún indicio de capacitación en dichos procesos.
- En la serie 6 se incubaron espermatozoides de ratón CD-1 durante 60 min en concentraciones crecientes de CAT, para evaluar el efecto de los AOs sobre la funcionalidad espermática, y comprobar si estos elementos son capaces de causar un retraso en el proceso de la capacitación.
- Las series 7 y 8 fueron realizadas en los laboratorios del MCNC-CSIC sobre ambos tipos de ratones, para verificar los resultados obtenidos en la Universidad de Massachusetts, poner a punto la técnica de WB en el laboratorio del MNCN, y comparar los resultados entre las técnicas de CEROS y SCA, así como las diferencias entre ratones CD-1 y *Mus musculus musculus* silvestre.

**Tabla 7.1** Diseño experimental Capítulo 7.

Serie 1	N = 5 ratones <i>Mus musculus musculus silvestre</i> .											(MNCN-CSIC)								
<b>Medio/Muestra</b>	<b>NCc</b>	<b>CAPc</b>	<b>Muestras</b>																	
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<b>BSA</b>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (µM)</b>	0	0	De 0 a 1000											De 0 a 1000						
Pruebas:	Viabilidad y movilidad mediante SCA (90 min).																			
Serie 2	N = 5 ratones <i>Mus musculus musculus silvestre</i>											(MNCN-CSIC)								
<b>Medio/Muestra</b>	<b>NCc</b>	<b>CAPc</b>	<b>Muestras</b>																	
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<b>BSA</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (µM)</b>	0	0	De 0 a 300											De 0 a 300						
Pruebas:	Viabilidad y movilidad mediante SCA (90 min).																			
Serie 3	N = 5 ratones <i>Mus musculus</i> CD-1											(UMAss- Amherst)								
<b>Medio/Muestra</b>	<b>NCc</b>	<b>CAPc</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>								
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
<b>BSA</b>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (µM)</b>	0	0	30	50	75	90	100	150	200	250	300	500								
Pruebas:	Viabilidad, movilidad mediante CEROS y capacitación (WB) (90 min).																			
Serie 4	N = 5 ratones <i>Mus musculus</i> CD-1											(UMAss- Amherst)								
<b>Medio/Muestra</b>	<b>NCc</b>	<b>CAPc</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>								
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
<b>BSA</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2x	2x	2x							
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (µM)</b>	0	0	15	50	75	100	150	200	250	0	50	200								
Pruebas:	Viabilidad, movilidad mediante CEROS y capacitación (WB) (90 min).																			
Serie 5	N = 5 ratones <i>Mus musculus</i> CD-1											(UMAss- Amherst)								
<b>Medio/Muestra</b>	<b>NCc</b>	<b>CAPc</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>								
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	2x	2x	2x								
<b>BSA</b>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (µM)</b>	-	+	15	50	75	100	150	200	250	0	50	200								
Pruebas:	Viabilidad, movilidad mediante CEROS y capacitación (WB) (90 min).																			
Serie 6	N = 5 ratones <i>Mus musculus</i> CD-1											(UMAss- Amherst)								
<b>Medio/Muestra</b>	<b>NCc</b>	<b>CAPc</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>										
<b>BSA/NaHCO<sub>3</sub></b>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+										
<b>CAT (U/mL)</b>	0	0	130	300	441	3000	300	3000	5290	8823										
Pruebas:	Motilidad mediante CEROS, y análisis de WB (60 min)																			

**Tabla 7.1 cont.** Diseño experimental Capítulo 7.

Serie 7	N = 5 ratones <i>Mus musculus</i> CD-1								(MNCN-CSIC)	
Medio/Muestra	NCc	CAPc	Muestras							
BSA/NaHCO <sub>3</sub>	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM)	0	0	De 30 a 250 μM							
Pruebas:	Viabilidad, WB y movilidad mediante SCA. 30 min en CAP, 90 min en NC.									

Serie 8	N = 5 ratones <i>Mus musculus</i>								(MNCN-CSIC)	
Medio/Muestra	NCc	CAPc	Muestras							
BSA/NaHCO <sub>3</sub>	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM)	0	0	De 30 a 250 μM							
Pruebas:	Viabilidad, WB y movilidad mediante SCA. 30 min en CAP, 90 min en NC.									

Concentración de BSA; 10 mg/mL. Concentración de bicarbonato 15 mM.

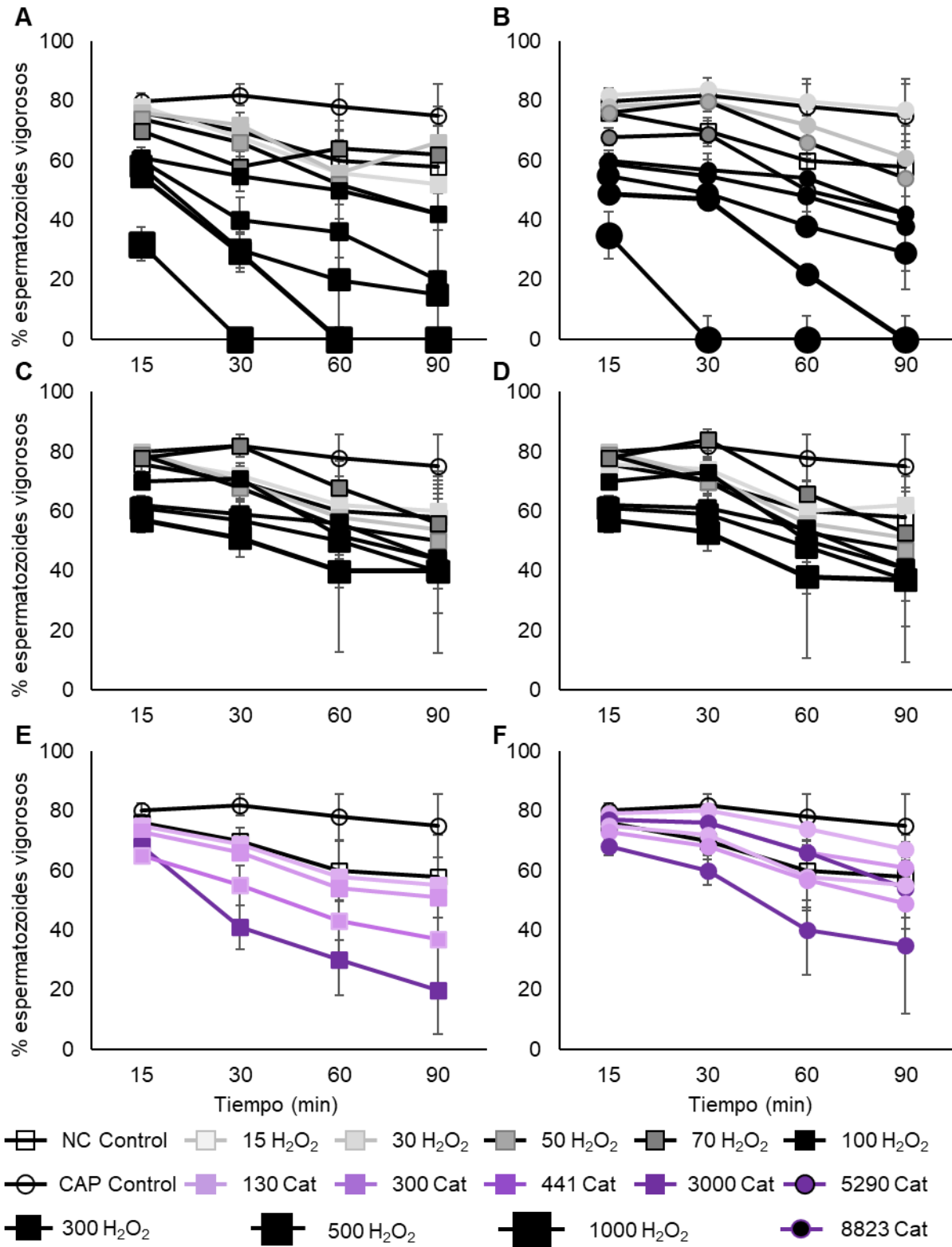
### 7.3. Resultados

#### 7.3.1. Efectos generales sobre la calidad espermática

El porcentaje de espermatozoides vigorosos a lo largo de los 90 min de incubación, evaluado mediante el software SCA, se ilustra en la **figura 7.1** y en las tablas S5.1 y S5.2 del anexo 3.

Este porcentaje disminuyó de manera proporcional al incremento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tanto en medio NC como en CAP, así como en el medio NC suplementado con BSA o bicarbonato sódico (**Fig. 7.1 A-D**). Concentraciones superiores a 250 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mostraron un porcentaje de espermatozoides vigorosos inferior al 50% a los 60 min de incubación, y menos del 20% a los 90 min de incubación. Debido a ello, sus resultados no serán ilustrados en el resto de los bloques.

El porcentaje de espermatozoides vigorosos también disminuyó de manera proporcional a la cantidad de CAT en el medio (**Fig. 7.1 E, F**), siendo un efecto menos pronunciado que el de los ROS.



**Figura 7.1:** Efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la CAT sobre el porcentaje de espermatozoides vigorosos, tras 90 min de incubación en medio NC (A), CAP (B), NC con BSA (C), NC con bicarbonato sódico (D), en concentraciones crecientes de ROS (en micromolar). Así como tras 90 min de incubación en medio NC (E) y CAP (F) en concentraciones crecientes de CAT (expresado en unidades enzimáticas por mililitro). Se muestran promedios ± S.E.M.

### 7.3.1. Efectos sobre la clasificación de espermatozoides

El porcentaje de cada clase espermática, empleando los criterios de clasificación del sistema CASAnova, se ilustran en la **figura 7.2**, y en las tablas S5.3 y S5.4. Estos datos fueron obtenidos tras la comparación de resultados entre laboratorios, indicado al final del apartado de metodología general (sección 3.10). Se ilustran los resultados obtenidos en el CSIC tras incubación en condiciones NC y concentraciones crecientes de ROS (**Fig. 7.2 A-C**), así como los obtenidos en la Universidad de Massachusetts, a los 60 min de incubación en ambos medios, con concentraciones crecientes de CAT (**Fig. 7.2 D-F**).

En el caso de la incubación en presencia de ROS, se hizo el estudio de la progresión temporal, con el objetivo de determinar una aceleración en los procesos de capacitación o deterioro celular. En el caso de las incubaciones con CAT, el estudio se centró únicamente a los 60 min de la incubación, al ser éste el tiempo experimental más importante para la fecundación, y momento en el cual se observan mayores diferencias entre los controles NCc y CAPc en los espermatozoides de ratón.

#### 7.3.1.1. Efectos de ROS sobre cada clase espermática

El estudio sobre la progresión temporal de cada clase espermática en base a la presencia de ROS se realizó únicamente en condiciones de supervivencia, para tratar de determinar la capacidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de inducir la capacitación.

El 98% de los espermatozoides vigorosos del NCc fue progresivo durante los 90 min de incubación (**Fig. 7.2 A**).

La muestra con 15 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tuvo valores próximos a los del control, hasta los 90 min de incubación, momento en el que presentó un incremento significativo de intermedios (2%) e HA (5%), alcanzando valores significativamente superiores a los de NCc en el caso de los intermedios (**Fig. 7.2 B**) y al del resto de las muestras, en el caso de HA (**Fig. 7.2 C**).

La muestra con 30 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, presentó valores similares a los del control en cada clase espermática, a excepción de los 30 min de incubación, donde se tuvo una disminución significativa en el porcentaje de progresivos, con incremento de

intermedios e HA. Al final de la incubación esta muestra presentó significativamente más espermatozoides HA que el control.

La muestra con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tuvo el menor porcentaje de progresivos a los 30 y 90 min de toda la serie, momentos en los que tuvo un porcentaje de espermatozoides intermedios significativamente superior al de NCc y un porcentaje de HA superior al del resto de las muestras.

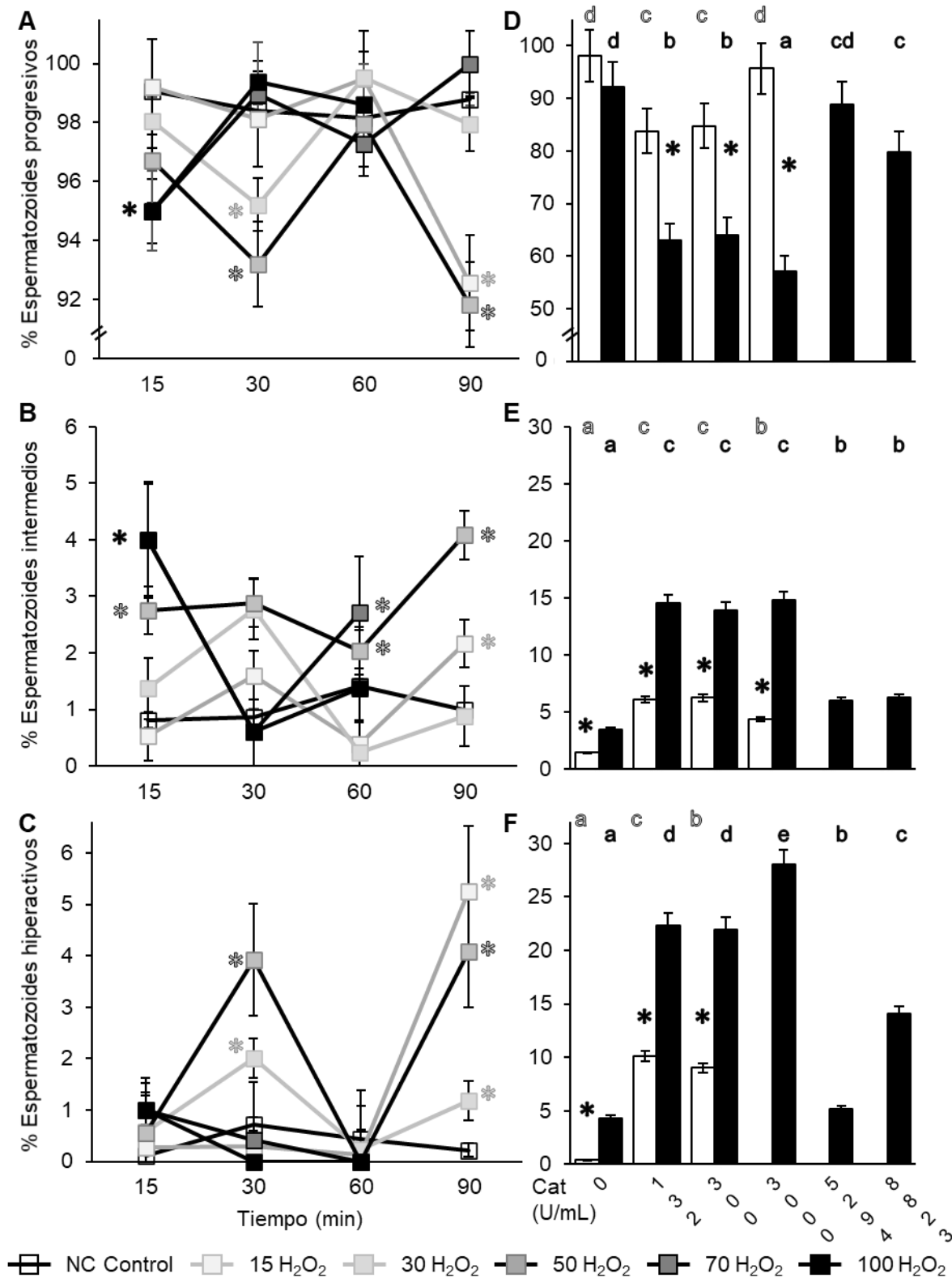
Los espermatozoides incubados con 70 y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no mostraron diferencias significativas respecto al control en el porcentaje de progresivos e intermedios, pero tuvieron el menor porcentaje de HA de toda la serie.

#### **7.3.1.1. Efectos de la CAT sobre cada clase espermática**

La determinación de cada clase espermática en base a la presencia de CAT se realizó tanto en condiciones de supervivencia como capacitantes, únicamente a los 60 min de incubación, para tratar de determinar si los AOs son capaces de variar dicho porcentaje en el momento más importante de la fecundación en espermatozoides de ratón.

En condiciones de supervivencia, el porcentaje de espermatozoides progresivos disminuyó significativamente respecto al NCc, a los 60 min de incubación con 132 y 300 unidades enzimáticas de CAT por mililitro (U/mL) (**Fig. 7.2 D**), sin detectarse diferencias respecto al NCc en la muestra con 3000 U/mL. En aquellas muestras con CAT, el porcentaje de espermatozoides intermedios y HA aumentó significativamente respecto al control (**Fig. 7.2 E, F**).

En condiciones capacitantes, el porcentaje de espermatozoides progresivos disminuyó respecto a CAPc en las muestras incubadas durante 60 min con CAT, generando significativamente más intermedios e HA, que ambos controles.



**Figura 7.2:** Efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A-C) a lo largo de la incubación en medio no capacitante, y de la CAT (D-F) a los 60 min (B-F), en medio NC (blanco) o CAP (negro), sobre el porcentaje de espermatozoides progresivos (A, B), “intermedios” (C, D) e hiperactivos (E, F). Se muestran promedios ± S.E.M. Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre medios se indican mediante asteriscos, y aquellas entre muestras, mediante letras (“negrita” = NC, simple = CAP). Nótese que por mantener un equilibrio de tamaño, las figuras no están a escala (véase la gradación del eje de ordenadas).

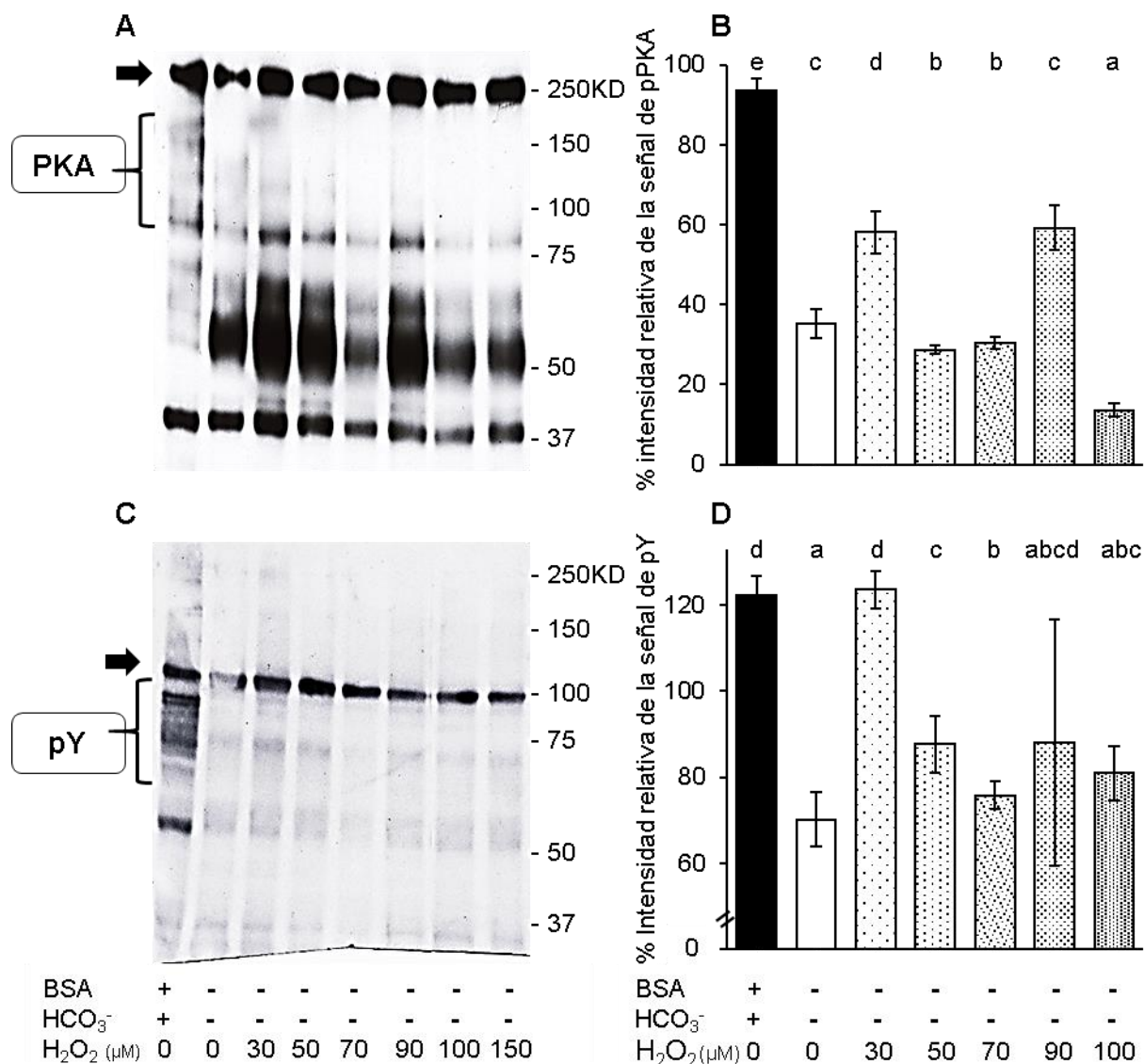


### 7.3.2. Efectos sobre la señalización espermática del proceso de la capacitación

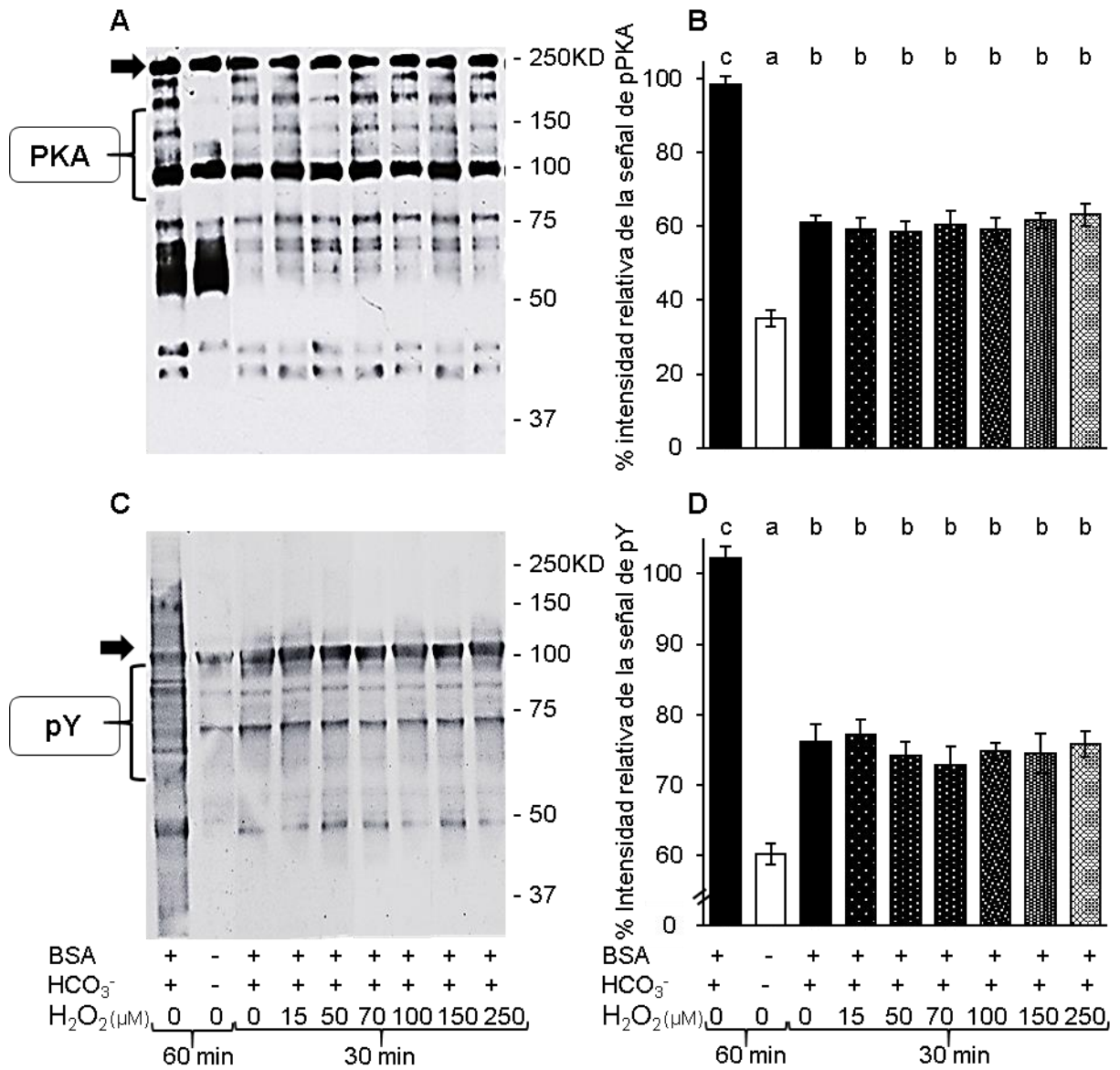
En la **figura 7.3** se muestra el efecto de ROS sobre la capacitación, tras 90 min de incubación en medio NC en presencia de distintas concentraciones de ROS. Los controles están referidos a los 60 min de incubación, mientras que el resto de las muestras fueron analizadas a los 90 min de incubación. El patrón de fosforilación de pPKA (**Fig. 7.3 A**) y el de pY (**Fig. 7.3 C**), no presentó diferencias respecto a NCc debidas a las concentraciones crecientes de ROS (de 30 a 300  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Sin embargo, las muestras con hasta 90  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  presentaron una intensidad relativa de la señal de pPKA (**Fig. 7.3 B**) y de pY (**Fig. 7.3 D**) significativamente superior a la de NCc.

En la **figura 7.4** se ilustra el efecto de los ROS sobre la capacitación en condiciones capacitantes. Los controles están referidos a los 60 min de incubación, mientras que el resto de las muestras fueron analizadas a los 30 min de incubación. Todas las muestras presentaron un patrón de fosforilación de pPKA (**Fig. 7.4 A**) y de pY (**Fig. 7.4 C**) similares al de NCc a los 60 min de incubación. Para ambos tipos de proteínas, la intensidad relativa de la señal de las muestras fue intermedia entre la de ambos controles, y sin tener diferencias entre ellas (**Fig. 7.4 B, D**).

En las **figuras 7.5 y 7.6** se ilustra el efecto de los ROS sobre la capacitación de espermatozoides incubados durante 90 min en medio NC suplementado con BSA o bicarbonato sódico, respectivamente.



**Figura 7.3:** Efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre el patrón de fosforilación de proteínas de la capacitación tras 60 min (controles) o 90 min de incubación (resto de las muestras) en medio NC. *Blots* de proteínas fosforiladas por PKA (pPKA) (A) y en residuos de tirosina (pY) (C). El patrón de peso molecular se indica a la derecha. La intensidad relativa de la señal de las bandas englobadas por la llave fue obtenida por densitometría, normalizando mediante el control de carga (indicado por una flecha). En las gráficas se representan los promedios ± S.E.M de la señal de pPKA (B) y de pY (D) en todas las condiciones experimentales. Medios NC (blanco) y CAP (negro). Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre muestras están indicadas por letras. Nótese que por mantener un equilibrio de tamaño, las figuras no están a escala (véase la gradación del eje de ordenadas).



**Figura 7.4:** Efectos

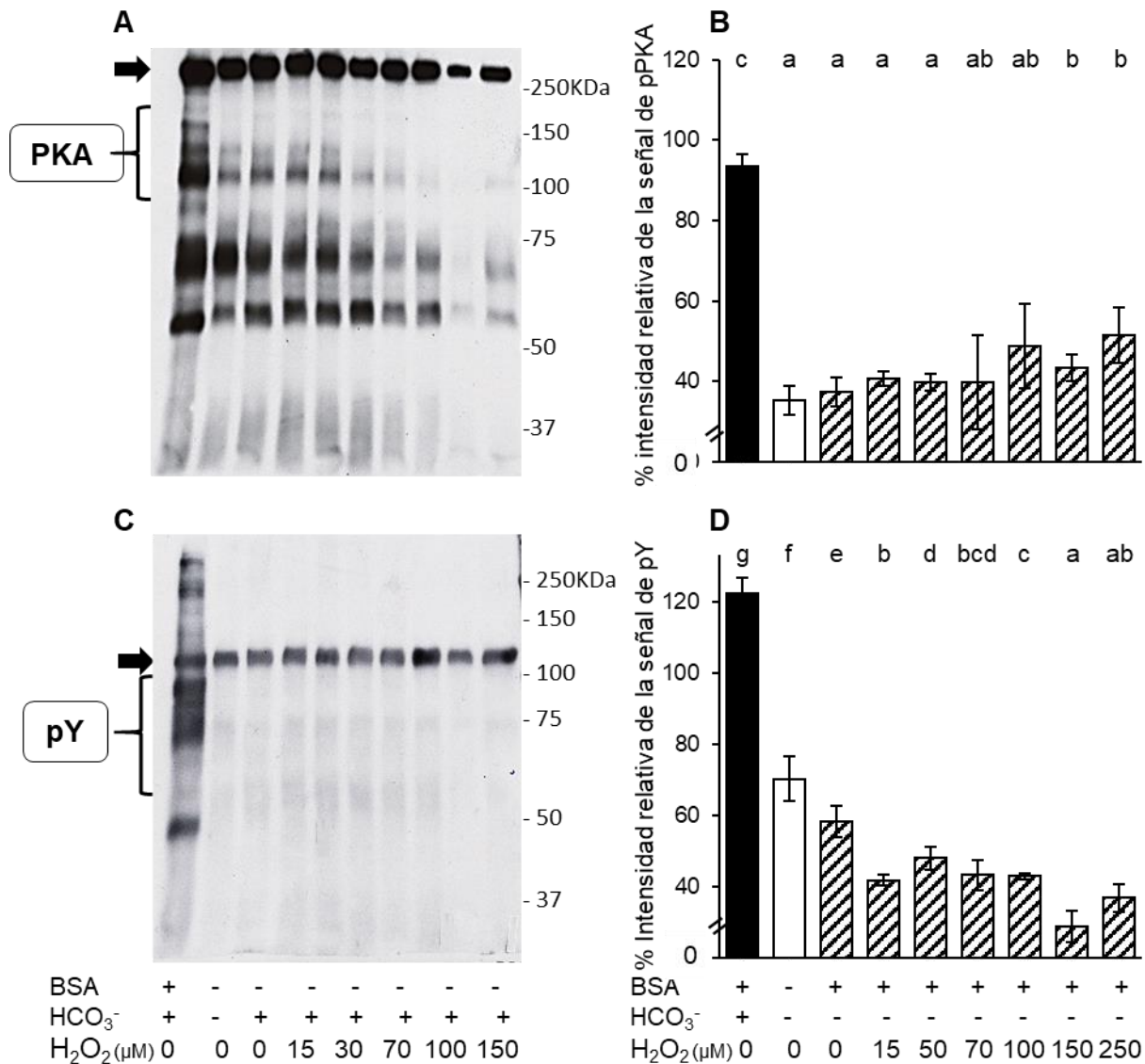
sobre el patrón de fosforilación de proteínas de la capacitación tras 30 min de incubación en medio CAP con concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Blots* de proteínas fosforiladas por PKA (pPKA) (A) y en residuos de tirosina (pY) (C). El patrón de peso molecular se indica a la derecha. La intensidad relativa de la señal de las bandas englobadas por la llave fue obtenida por densitometría, normalizando mediante el control de carga (indicado por una flecha). En las gráficas se representan los promedios ± S.E.M de la señal de pPKA (B) y de pY (D) de todas las condiciones experimentales. Medios NC (blanco) y CAP (negro). Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre muestras están indicadas por letras.

En las muestras incubadas durante 90 min en medio TYH con 10 mg/mL de BSA, no se observaron diferencias respecto a NCc en el patrón de pPKA (**Fig. 7.5 A**), ni de pY (**Fig. 7.5 C**). La intensidad relativa de la señal de pPKA de las distintas muestras fue similar al de NCc, e inferior al de CAPc, en ambos tipos de proteína. Únicamente las muestras con 150 y 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  revelaron una intensidad relativa de pPKA superior al NCc (**Fig. 7.5 B**). La intensidad de la señal de pY fue significativamente inferior a la de NCc en todas las muestras, con menor señal a mayor concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (**Fig. 7.5 D**).

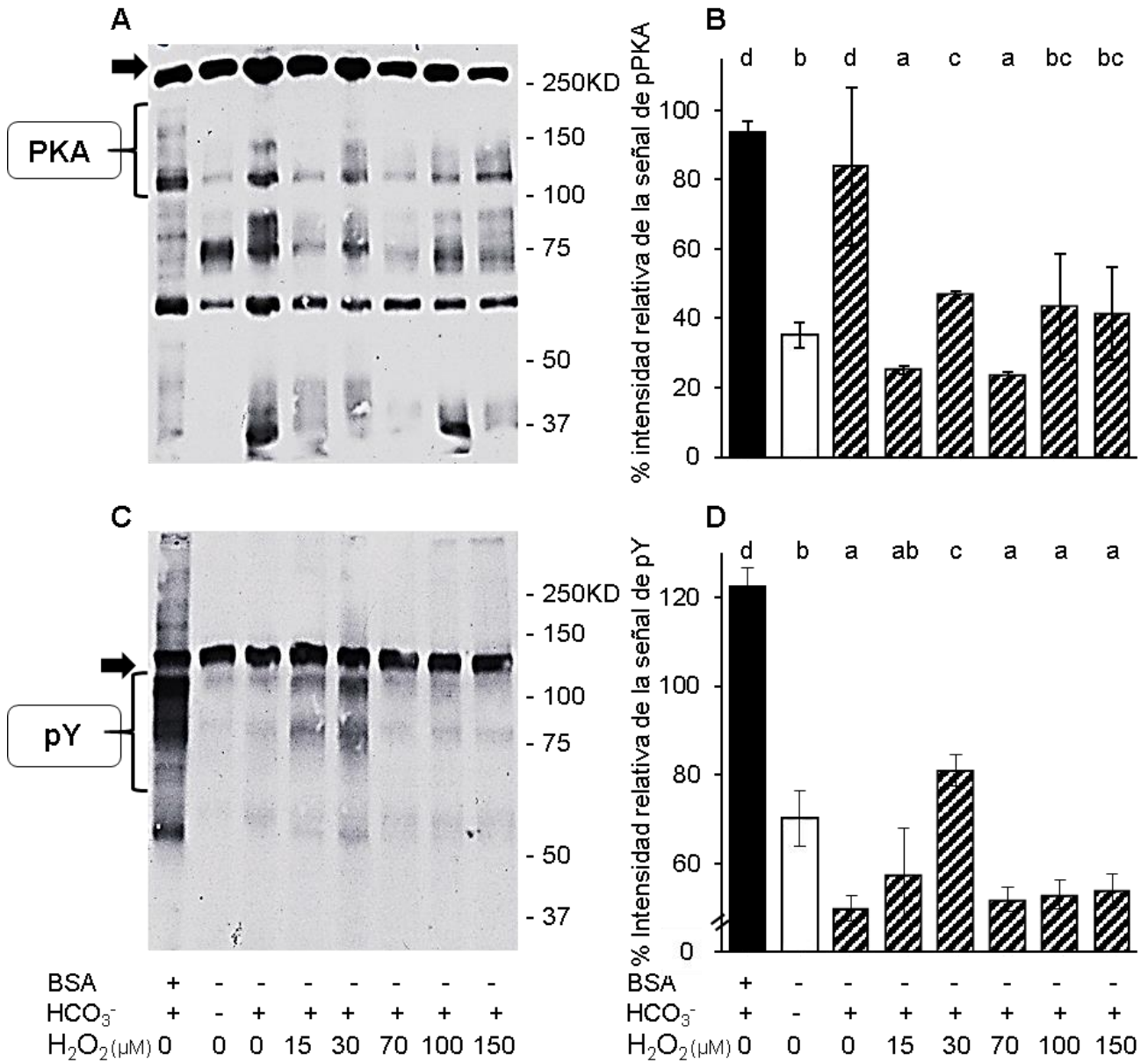
En las muestras incubadas durante 90 min en medio TYH con 15 mM de bicarbonato sódico, el patrón de fosforilación tanto de pPKA como de pY fue distinto al de CAPc y al de NCc a los 60 min de incubación. En la muestra sin radicales libres, el perfil proteico fue similar al de NCc, pero con presencia de proteínas fosforiladas de aproximadamente 80, 90 y 150 kDa (para pPKA) y de 60 y 75 kDa (para pY) que no aparecen en los controles de ningún tiempo experimental (**Fig. 7.6 A, C**). Las distintas muestras incubadas en medio TYH con bicarbonato sódico y concentraciones crecientes de ROS, no tuvieron diferencias en su patrón respecto al de la muestra en medio TYH con bicarbonato sódico sin ROS.

La intensidad relativa de la señal de ambos grupos de proteínas presentó diferencias entre cada muestra, sin poder identificarse un patrón de respuesta asociado a la cantidad de ROS en el caso de pPKA (**Fig. 7.6 B**), pero si en el caso de pY (**Fig. 7.6 D**): La muestra con bicarbonato sódico sin ROS, reveló una intensidad de pPKA similar a la de CAPc, mientras que aquellas con 15 y 70  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  tuvieron una intensidad de pPKA significativamente inferior a la de NCc.

La intensidad relativa de pPKA de la muestra con 30  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue significativamente superior a la de NCc, y las muestras con más de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  tuvieron valores intermedios entre NCc y la muestra de 30  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En el caso de la intensidad relativa de pY, únicamente la muestra con 30  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  presentó una intensidad relativa de la señal de pY significativamente superior a la de NCc, pero significativamente inferior a la de CAPc, siendo la señal del resto de las muestras estadísticamente inferior a NCc.



**Figura 7.5:** Efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre el patrón de fosforilación de proteínas de la capacitación tras 90 min de incubación en medio NC suplementado con 10 mg/mL BSA. Blots de proteínas fosforiladas por PKA (pPKA) (A) y en residuos de tirosina (pY) (C). El patrón de peso molecular se indica a la derecha. La intensidad relativa de la señal de las bandas englobadas por la llave fue obtenida por densitometría, normalizando mediante el control de carga (indicado por una flecha). En las gráficas se representan los promedios ± S.E.M de la señal de pPKA (B) y de pY (D) de todas las condiciones experimentales. Medios NC (blanco) y CAP (negro). Las diferencias significativas (p ≤ 0.05) entre muestras están indicadas por letras.



**Figura 7.6:** Efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre el patrón de fosforilación de proteínas de la capacitación tras 90 min de incubación en medio NC suplementado con 15 mM de NaHCO<sub>3</sub>. Blots de proteínas fosforiladas por PKA (pPKA) (A) y en residuos de tirosina (pY) (C). El patrón de peso molecular se indica a la derecha. La intensidad relativa de la señal de las bandas englobadas por la llave fue obtenida por densitometría, normalizando mediante el control de carga (indicado por una flecha). En las gráficas se representan los promedios ± S.E.M de la señal de pPKA (B) y de pY (D) de todas las condiciones experimentales. Medios NC (blanco) y CAP (negro). Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre muestras están indicadas por letras. Nótese que por mantener un equilibrio de tamaño, las figuras no están a escala (véase la gradación del eje de ordenadas).

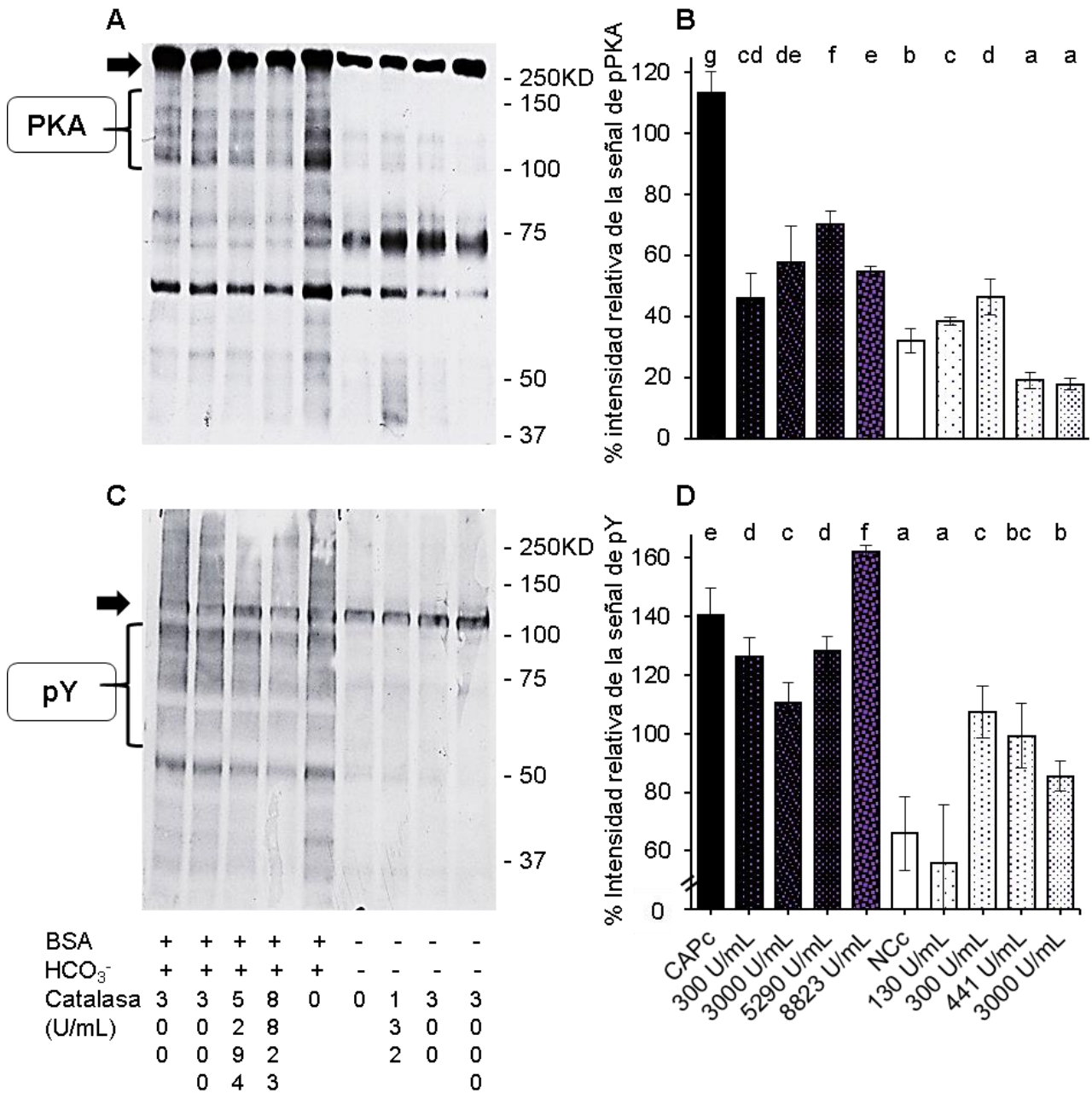
En la **figura 7.7** se ilustra el efecto de CAT sobre el patrón de fosforilación de las muestras incubadas en ambos medios, durante 60 min.

No se observaron diferencias significativas debidas a CAT en los patrones de fosforilación de pPKA (**Fig. 7.7 A**) ni de pY (**Fig. 7.7 C**) respecto al control de cada medio de cultivo, es decir, las muestras incubadas en medio CAP con CAT no tuvieron diferencias respecto a CAPc, y aquellas incubadas en medio NC con CAT, no presentaron diferencias respecto a NCc.

La intensidad relativa de la señal de pPKA fue significativamente superior a NCc en las muestras incubadas en medio NC con 130 y 300 U/mL (**Fig. 7.7 B**). Las muestras incubadas en medio NC con 441 y 3000 U/mL tuvieron una intensidad relativa de pPKA inferior a la de NCc. Todas las muestras incubadas en condiciones de supervivencia tuvieron una intensidad relativa de la señal de pPKA y de pY significativamente inferior a la de CAPc (**Fig. 7.7 D**). Además, todas las muestras incubadas en medio NC con CAT presentaron una intensidad de pY significativamente superior a la de NCc y estadísticamente inferior a la de CAPc, con la excepción de aquella con 130 U/mL, que tuvo la menor intensidad de pY de toda la serie experimental.

En condiciones capacitantes, todas las muestras tuvieron una intensidad relativa de la señal de pPKA y de pY significativamente inferior a la de CAPc, con la excepción de la muestra con 8823 U/mL, que presentó la mayor intensidad de pY de toda la serie experimental (**Fig. 7.7 D**).

Los valores numéricos de la intensidad relativa de la señal a la que refieren las figuras anteriores pueden encontrarse en el anexo 3, tablas S5.5 y S5.6.



**Figura 7.7:** Efectos de la catalasa sobre el patrón de fosforilación de proteínas de la capacitación tras 60 min de incubación en medio NC (blanco) o CAP (negro) con concentraciones crecientes de CAT (en Unidades/mL). *Blots* de proteínas fosforiladas por PKA (pPKA) (A) y en residuos de tirosina (pY) (C). El patrón de peso molecular se indica a la derecha. La intensidad relativa de la señal de las bandas englobadas por la llave fue obtenida por densitometría, normalizando mediante el control de carga (indicado por una flecha). En las gráficas se representan los promedios ± S.E.M de la señal de pPKA (B) y de pY (D) de todas las condiciones experimentales. Medios NC (blanco) y CAP (negro). Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre muestras están indicadas por letras. Nótese que por mantener un equilibrio de tamaño, las figuras no están a escala (véase la gradación del eje de ordenadas).



### 7.3.3. Efectos sobre la cinética espermática

Se analizaron los datos de los 8 parámetros de la cinética espermática generados por el sistema CASAnova para los espermatozoides identificados como vigorosos (tablas S5.7, S5.8, S5.11 y S5.12). Estos datos se procesaron mediante dos Análisis de Componentes Principales (PCA) realizado tanto en los parámetros de velocidad como de trayectoria. Un resumen de sendos análisis se encuentra en la **tabla 7.2** y en la **figura 7.8**.

**Tabla 7.2:** Contribución de cada parámetro de la cinética espermática a cada componente principal (PC).

Componente principal	OSV 1		OSV 2		OTS 1		OTS 2	
	Autovector	R	Autovector	R	Autovector	R	Autovector	R
<b>VAP</b>	0,60	<b>0,98</b>	-0,10	-0,05	NA	NA	NA	NA
<b>VSL</b>	0,57	<b>0,93</b>	-0,64	-0,34	NA	NA	NA	NA
<b>VCL</b>	0,56	<b>0,91</b>	0,76	0,40	NA	NA	NA	NA
<b>ALH</b>	NA	NA	NA	NA	0,02	0,03	0,76	<b>0,92</b>
<b>BCF</b>	NA	NA	NA	NA	0,33	<b>0,52</b>	0,60	<b>0,73</b>
<b>STR</b>	NA	NA	NA	NA	0,52	<b>0,83</b>	-0,01	-0,01
<b>LIN</b>	NA	NA	NA	NA	0,61	<b>0,98</b>	-0,15	<b>-0,18</b>
<b>WOB</b>	NA	NA	NA	NA	0,51	<b>0,81</b>	-0,22	<b>-0,27</b>
<b>Autovalor:</b>	88,80 %		9,10 %		51,5 %		29,6 %	

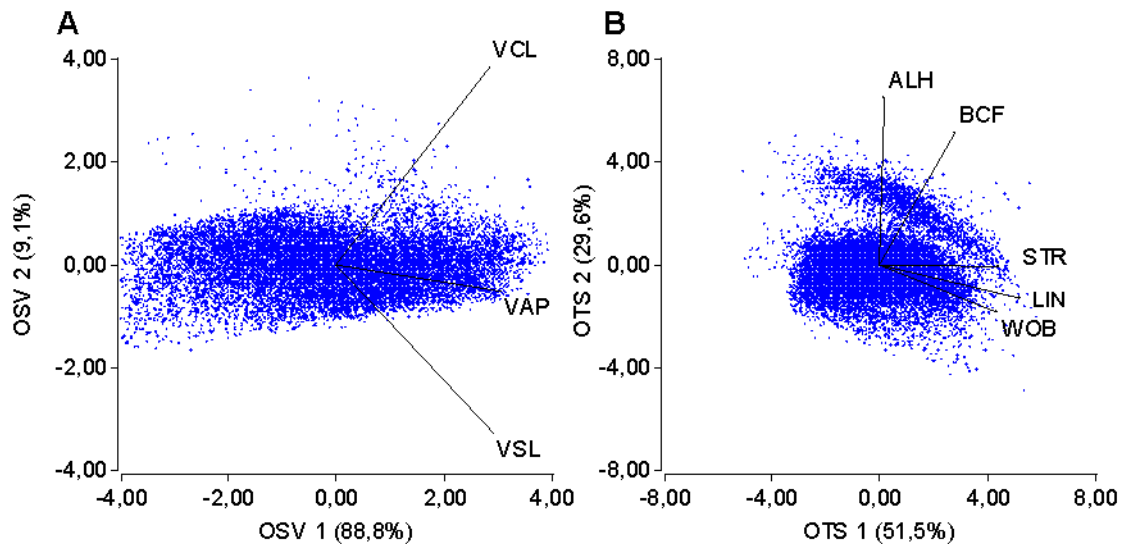
Se indica el coeficiente de correlación de cada parámetro con su PC mediante la R de Pearson. En negrita, aquellas con correlación significativa ( $p \leq 0.05$ ). El autovalor indica cuánto contribuye ese componente a la explicación de las variaciones observadas.

Siguiendo la definición de "trayectoria", "recorrido" y "desplazamiento" definidos anteriormente, los distintos CP pueden ser descritos de la siguiente manera:

OSV1 explica el 88.80 % de las diferencias encontradas en los parámetros de velocidad espermática. Debido a que OSV2 explica menos del 10% de las variaciones detectadas para los parámetros de la velocidad, no se tendrá en cuenta en la descripción de sus variaciones significativas.

OTS1 justifica el 51.5 % de las diferencias encontradas en la trayectoria, y aumenta con trayectorias más lineales y menos oscilantes.

OTS2 explica el 29.6% de las diferencias encontradas en la trayectoria de los espermatozoides, y aumenta cuando las trayectorias exhiben oscilaciones más amplias y rápidas.



**Figura 7.8.** Análisis de componentes principales en la que se indica la contribución de cada parámetro de la cinética espermática a cada componente principal (PC). Gráfico de componentes principales de velocidad (OSV1 y OSV2) (A) y de la trayectoria (OTS1 y OTS2) (B).

Para abordar mejor los resultados obtenidos, se presentarán primero los resultados debidos a los ROS a lo largo de la incubación (90 min) tanto para velocidad como trayectoria. Dado que los primeros 60 min son importantes en el proceso de la capacitación (ver sección 1.2.3 de la Introducción), los resultados de dicho tiempo experimental serán descritos posteriormente de manera individual. Finalmente, se presentará el efecto de la CAT a los 60 y 90 min, tanto sobre la velocidad como de la trayectoria, de manera que se pueda determinar si existe, o no, un efecto antagónico entre ambas sustancias.

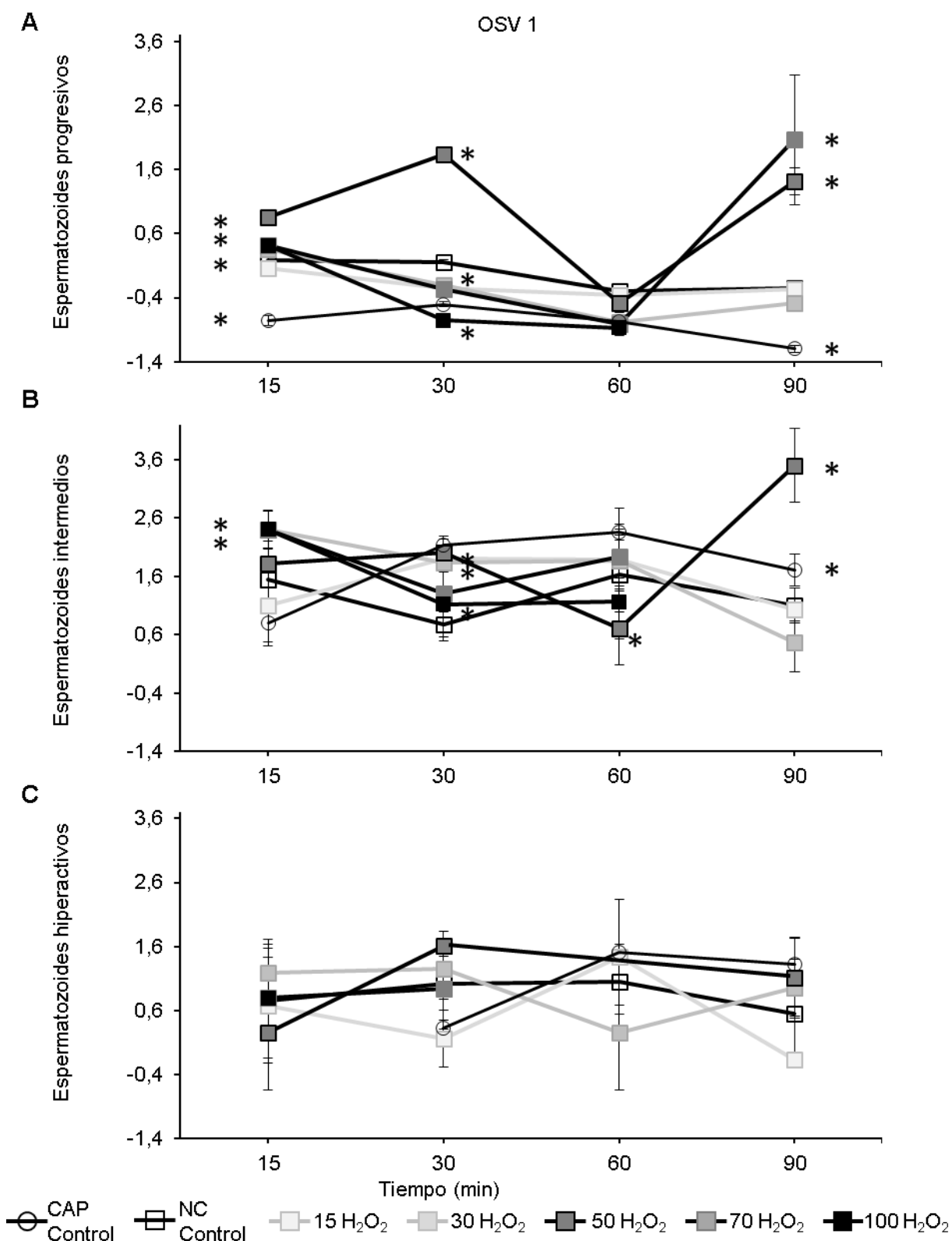
### 7.3.3.1. Efectos de los ROS sobre la velocidad

Los espermatozoides progresivos de CAPc fueron significativamente más lentos a los de NCc durante toda la incubación, y más lentos que el resto de las muestras a los 15 y 90 min. Las muestras incubadas en medio NC con más de 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , presentaron una OSV1 significativamente más alta que la de los controles a los 15 min de incubación, pero con ulterior disminución a valores estadísticamente inferiores a los de NCc, a partir de los 30 min de incubación (**Fig. 7.9 A**). La muestra con 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , alcanzó un valor intermedio entre ambos controles al inicio de la incubación, manteniendo sus valores a lo largo de ésta, sin mostrar diferencias respecto a NCc a partir de los 60 min. La muestra con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , reveló a los 30 y 90 min una OSV1 significativamente

superior a la del resto de las muestras, con la excepción de aquella con 70  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , al final de la incubación. Las muestras con 70 y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , no presentaron diferencias respecto a CAPc a los 60 min de incubación.

Los espermatozoides intermedios del CAPc, mostraron valores de OSV1 bajos al inicio de la incubación, y un incremento significativo a partir de los 30 min. El resto de las muestras, tuvieron valores estadísticamente inferiores a CAPc a partir de los 30 min de incubación, con la excepción de aquella con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que tuvo los espermatozoides más rápidos al final de la incubación. La mayoría de las muestras, presentaron valores de OSV1 significativamente superiores a los de NCc desde el inicio de la incubación, sin mostrar diferencias con NCc al final de esta (**Fig. 7.9 B**).

Los espermatozoides HA no presentaron diferencias significativas respecto a NCc en toda la incubación, con la excepción de las muestras incubadas en medio NC con 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o de CAPc, que a los 30 min de incubación tuvieron los menores valores de OSV1 de los espermatozoides HA, sin diferencias en el resto de la incubación (**Fig. 7.9 C**). Consultar los datos estadísticos en la tabla S5.9.



**Figura 7.9.** Promedio del componente principal de la velocidad (OSV1) de los espermatozoides incubados durante 90 min en medio NC a distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), en las distintas clases espermáticas; progresivos (A), intermedios (B) e hiperactivos (C). Se representan las medias ± SEM. Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) respecto a NCc se indican con un asterisco. Todas las concentraciones vienen indicadas en micromolar.

### 7.3.3.2. Efectos de los ROS sobre la trayectoria

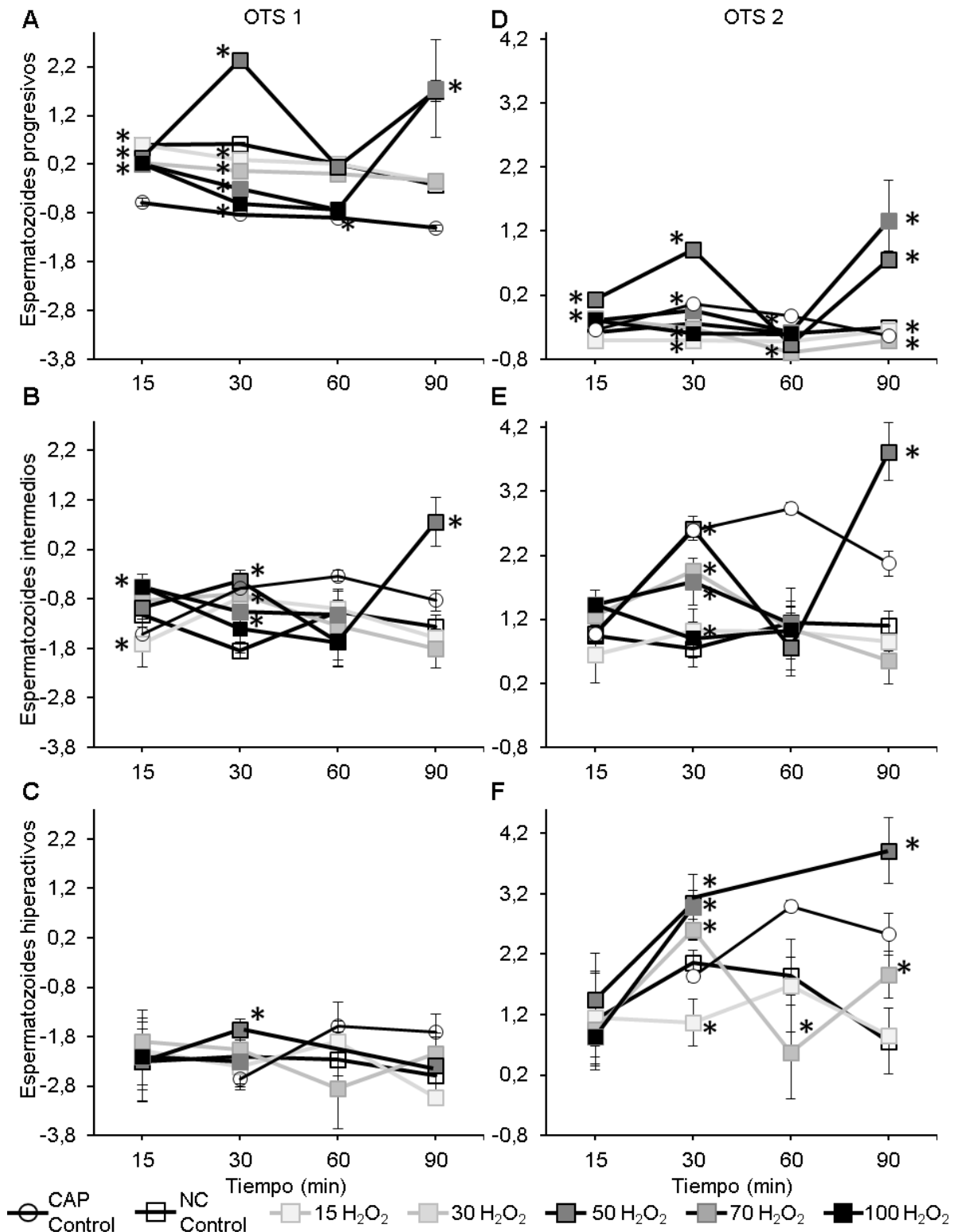
Los espermatozoides progresivos del NCc, mostraron valores constantes de OTS1 a lo largo de la incubación. Los de CAPc, tuvieron los menores valores de toda la serie (**Fig. 7.10 A**). Las muestras incubadas en medio NC con ROS, presentaron una OTS1 significativamente inferior a la de NCc a lo largo de la incubación, con la excepción de aquella con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que tuvo dos picos de OTS1 a los 30 y 90 min de incubación. A los 60 min, la OTS1 de las muestras con 70 y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue significativamente inferior a la de NCc. A los 90 min, las muestras con 50, 70 y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  presentaron los mayores valores de OTS1 de los espermatozoides progresivos. Ver tabla S5.10.

En el caso de los intermedios, la mayoría de las muestras tuvieron un OTS1 estadísticamente superior a los de NCc, a los 15 y 30 min de incubación y significativamente inferiores a partir de los 60 min (**Fig. 7.10 B**). CAPc alcanzó valores de OTS1 significativamente superiores a los del resto de las muestras, en todos los tiempos experimentales, siendo superado únicamente por aquella con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al final de la incubación.

Los espermatozoides HA, no presentaron diferencias significativas respecto a NCc, salvo la muestra con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que tuvo valores significativamente superiores al resto a los 30 min (**Fig. 7.10 C**).

Respecto al segundo componente de la trayectoria, CAPc alcanzó valores de OTS2 significativamente superiores a los de NCc durante toda la incubación. Además, las muestras incubadas en medio NCc con concentraciones de ROS inferiores a los 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , presentaron valores de OTS2 significativamente inferiores a los de NCc, mientras que las muestras con más de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , adquirieron valores significativamente superiores (**Fig. 7.10 D**).

En el caso de los espermatozoides intermedios e hiperactivos, las muestras del control capacitante, así como aquellas incubadas en medio NC con más de 30  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tuvieron valores de OTS2 significativamente superiores a los de NCc durante toda la incubación (**Fig. 7.10 F y G**). La muestra con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tuvo los valores de OTS2 de toda la serie experimental al final de la incubación, siendo superior en el caso de espermatozoides intermedios.



**Figura 7.10.** Promedio de los componentes principales de la trayectoria (OTS1, OTS2) de los espermatozoides incubados durante 90 min en medio NC a distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), en las distintas clases espermáticas; progresivos (A, D), intermedios (B, E) e hiperactivos (C, F). Se representan las medias ± SEM. Las diferencias significativas (p ≤ 0.05) respecto al NCc, se indican con un asterisco. Todas las concentraciones vienen indicadas en micromolar. Nótese que por mantener un equilibrio de tamaño, las figuras no están a escala (véase la gradación del eje de ordenadas).

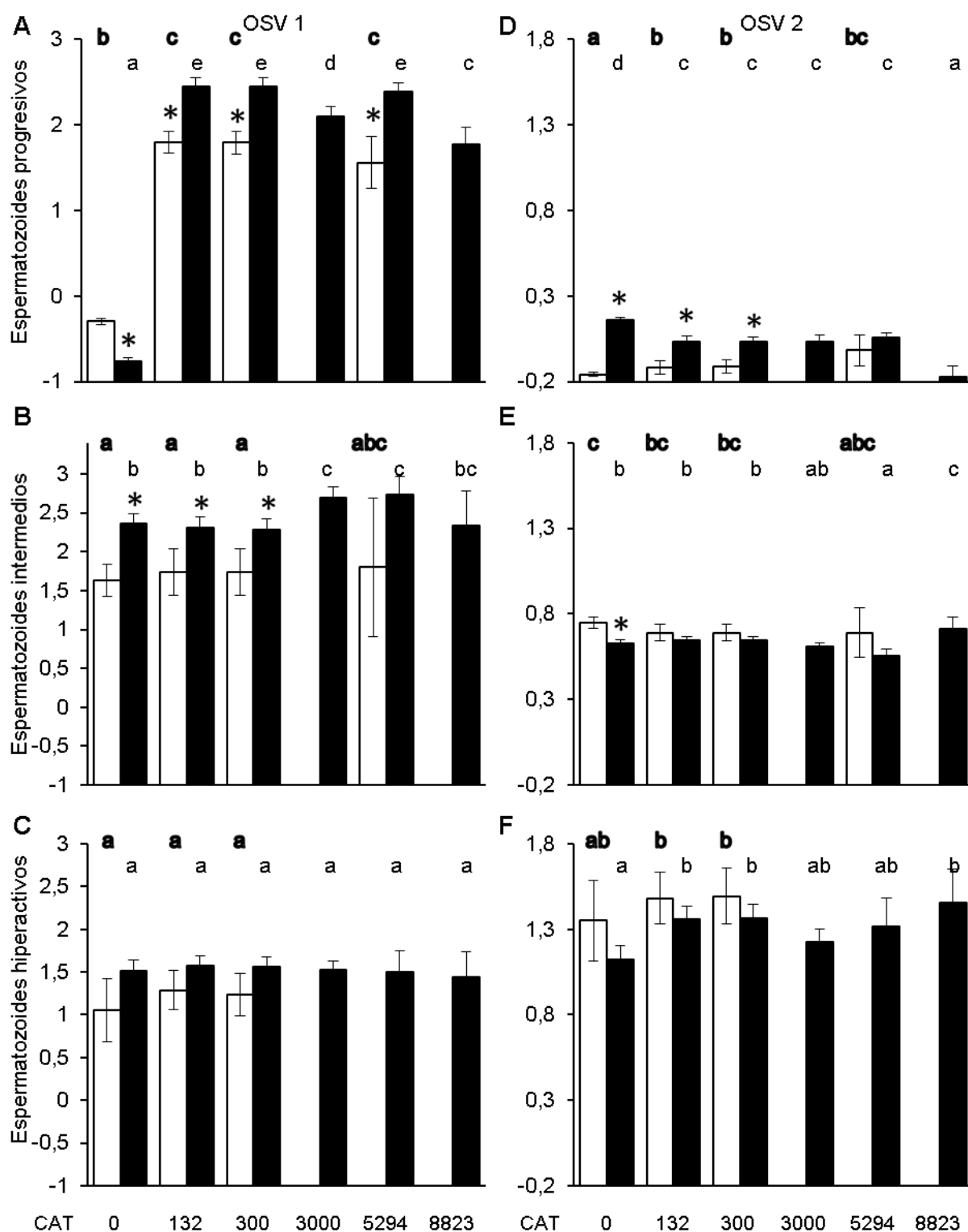
### 7.3.3.3. Efectos de la CAT sobre la velocidad

A los 60 min de incubación en ambos medios de cultivo, los espermatozoides progresivos incubados con concentraciones crecientes de CAT presentaron una velocidad significativamente superior a la de ambos controles (**Fig. 7.11 A**), con valores estadísticamente inferiores en las muestras del medio NC. Los espermatozoides incubados en medio CAP con 8823 U de CAT/mL, tuvieron los menores valores de OSV1 de todos aquellos incubados en CAP, sin presentar diferencias respecto a las muestras NC. En el caso de los espermatozoides intermedios e HA del medio NC, no se observaron diferencias de OSV1 debidos a la CAT (**Fig. 7.11 B y C**). Los espermatozoides intermedios incubados en medio CAP con más de 3000 U/mL, mostraron mayor OSV1 que CAPc, sin detectarse diferencias en los HA. Ver tabla S5.13.

### 7.3.3.4. Efectos de la CAT sobre la trayectoria

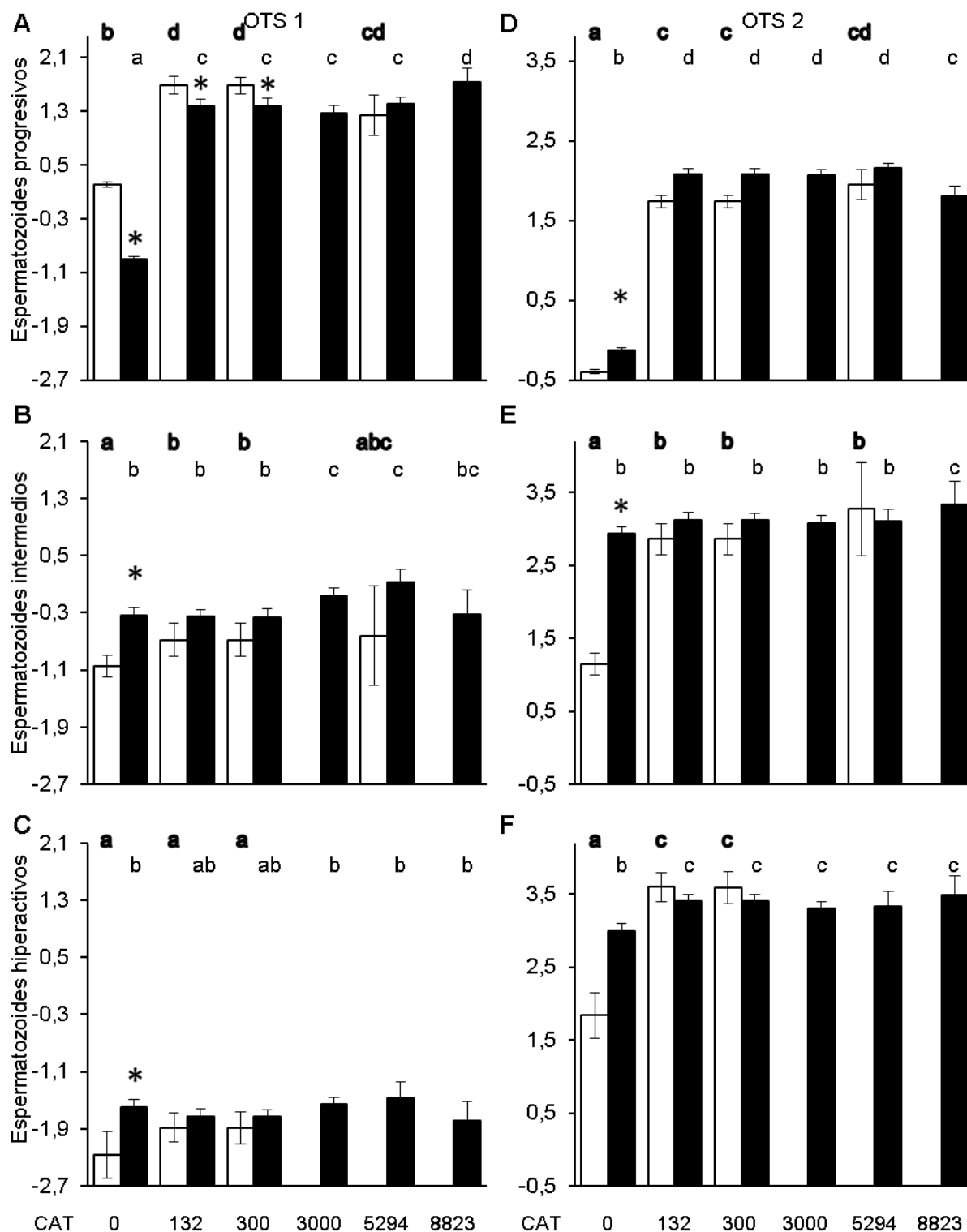
A los 60 min de incubación en ambos medios de cultivo, con concentraciones crecientes de CAT, los espermatozoides progresivos mostraron una OTS1 significativamente superior a la de ambos controles (**Fig. 7.12 A**), con valores estadísticamente superiores en las muestras del medio NC, respecto de aquellas en CAP. En el caso de los espermatozoides intermedios, las muestras con CAT tuvieron valores de OTS1 significativamente superiores a los de NCc (**Fig. 7.12 B**). En el caso del medio CAP, sólo las muestras con más de 3000 U/mL tuvieron OTS1 superiores a los de CAPc, con diferencias significativas en las de 3000 y 5294 U/mL. No se observaron diferencias debidas a CAT en los espermatozoides HA (**Fig. 7.12 C**). Consultar tabla S5.14.

En el caso de OTS2, se observó un patrón de respuesta similar al de OSV1: Los espermatozoides progresivos y HA incubados durante 90 min en medio con CAT, mostraron valores de OTS2 significativamente superiores respecto a los controles en ambos medios de cultivo (**Fig. 7.12 D, F**), siendo valores significativamente superiores en CAP respecto a NC en el caso de los progresivos, sin diferencia en HA. Todos los espermatozoides intermedios de las muestras con CAT tuvieron valores de OTS2 similares a los de CAPc y significativamente superiores a los de NCc (**Fig. 7.12 E**).



**Figura 7.11.** Promedio de los componentes principales de la velocidad; OSV1 (A-C) y OSV2 (D-F) de los espermatozoides incubados durante 60 min en medio NC (blanco) o CAP (negro) a distintas concentraciones de CAT (CAT), en las distintas clases espermáticas; progresivos (A, D), intermedios (B, E) e hiperactivos (C, F). Se representan las medias  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre medios se representan mediante un asterisco, y entre muestras mediante letras (negrita NC, normal CAP). Todas las concentraciones vienen indicadas en “unidades de CAT por mililitro”. Nótese que por mantener un equilibrio de tamaño, las figuras no están a escala (véase la gradación del eje de ordenadas).





**Figura 7.12.** Promedio de los componentes principales de la trayectoria; OTS1 (A-C) y OTS2 (D-F) de los espermatozoides incubados durante 60 min en medio NC (blanco) o CAP (negro) a distintas concentraciones de CAT (CAT), en las distintas clases espermáticas; progresivos (A, D), intermedios (B, E) e hiperactivos (C, F). Se representan las medias  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre medios se representan mediante un asterisco, y entre muestras mediante letras (negrita NC, normal CAP). Todas las concentraciones vienen indicadas en “unidades de CAT por mililitro”. Nótese que por mantener un equilibrio de tamaño, las figuras no están a escala (véase la gradación del eje de ordenadas).

## 8. FORMACIÓN DE RADICALES LIBRES POR LOS ESPERMATOZOIDEOS

---

### 8.1. Antecedentes

El proceso de la capacitación podría estar influenciado por concentraciones determinadas de ER en los espermatozoides de los mamíferos (Aitken *et al.*, 1997; Leclerc *et al.*, 1997; O'Flaherty *et al.*, 2006a). Se ha detectado un incremento progresivo y sostenido de ROS, principalmente  $H_2O_2$  y  $O_2^-$ , en los espermatozoides humanos tras la eyaculación (Lu *et al.*, 2018). Este hecho sugiere que el incremento controlado de ROS en el interior de los espermatozoides de los mamíferos, facilita los procesos de la capacitación y de la HA (de Lamirande *et al.*, 1997; Aitken *et al.*, 1998). Estos autores han asociado este evento a la posible capacidad de ROS para activar a la AC, así como para inactivar a las fosfatasa que bloquean la activación espontánea de PKA (Aitken, Paterson, *et al.*, 1995; Aitken *et al.*, 1998, 2015; Baker *et al.*, 2006). Además, el DO que ocasionan los ROS sobre las membranas plasmáticas podrían alterar su fluidez, permitiendo su reorganización, como evento propio de la capacitación (Aitken *et al.*, 1989; Aitken y Fisher, 1994).

Este capítulo tiene varios objetivos. Por un lado, determinar si los espermatozoides de ratón tienen la capacidad de generar ROS, y si este proceso está relacionado con el proceso de la capacitación. Por otro lado, investigar si existe cierta relación entre el calcio, el magnesio o el zinc sobre la supuesta producción de radicales libres intracelulares ([ROS]<sub>i</sub>) tanto en condiciones capacitantes (CAP) como de supervivencia.

### 8.2. Metodología particular

Se empleó la metodología descrita en el apartado 3.7 de Materiales y métodos generales de la tesis, para evaluar mediante citometría de flujo la concentración de ROS intracelular [ROS]<sub>i</sub> a lo largo de una incubación de 60 min en condiciones de supervivencia o capacitación, en presencia o ausencia de calcio, magnesio, zinc y 100  $\mu$ M de  $H_2O_2$ . Para ello, se utilizó la sonda citométrica  $H_2DCFDA$ , así como un marcador de muerte celular (SYTOX™ *Red Dead Cell Stain*).

Como desviación al método general, se tuvo que el medio TYH modificado sin rojo fenol, al ser el rojo fenol un antioxidante de color rojo, y por lo tanto interferir con ambas sondas citométricas (ver sección 3.7 de metodología). Tampoco se incluyeron el medio albúmina, bicarbonato sódico, calcio ni magnesio, al ser parte de las variables de estudio.

Se realizaron 4 series experimentales, empleando en cada una de ellas 5 ratones CD-1. Después del lavado mediante centrifugación de la suspensión espermática obtenida de cada ratón, se diluyeron los espermatozoides en las condiciones experimentales requeridas, que están indicadas en la **tabla 8.1**, así como en contacto con la sonda detectora de [ROS]<sub>i</sub> (H<sub>2</sub>DCFDA).

- En la primera serie experimental, los espermatozoides fueron incubados en medio de supervivencia o capacitante, en presencia o ausencia de 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

- En las cuatro series siguientes, se comprobó el efecto de la ausencia de calcio (serie 2), ausencia de magnesio (serie 3) o presencia de zinc (serie 4), sobre la formación de ROS. Además, en las 4 series se incubaron los espermatozoides en presencia, o no, de 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Antes del análisis citométrico, una alícuota de cada muestra fue diluida a la concentración de trabajo y posteriormente incubada con la sonda de vitalidad, siguiendo lo descrito por el apartado 3.7 de la metodología general.

Mediante la determinación cuantitativa del incremento de la señal de H<sub>2</sub>DCFDA debido al suplemento de 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el control CAP, extrapolaremos los valores de incremento de ROS en el resto de las muestras.

Tabla 8.1. Diseño experimental del capítulo 8.

Muestra	Serie 1				Serie 2				Serie 3				Serie 4			
	NCc	CAPc	1	2	NCc	CAPc	3	4	NCc	CAPc	5	6	NCc	CAPc	7	8
BSA	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
NaHCO <sub>3</sub>	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
Ca <sup>2+</sup>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Mg <sup>2+</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Zn <sup>2+</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

NCc = Control del medio de supervivencia. CAPc = Control del medio capacitante. NaHCO<sub>3</sub>= Bicarbonato. BSA = Albúmina. Ca<sup>2+</sup> = Calcio. Mg<sup>2+</sup> = magnesio. Zn<sup>2+</sup> = zinc. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peróxido de hidrógeno. 1 = muestra en condiciones NC con suplemento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 2 = muestra en condiciones CAP con suplemento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 3 = muestra en condiciones CAP en ausencia de calcio, en ausencia o presencia (4) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 5 = muestra en condiciones CAP en ausencia de magnesio, en ausencia o presencia (6) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 7 = muestra en condiciones CAP en presencia de zinc, en ausencia o presencia (8) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 8.3.Resultados

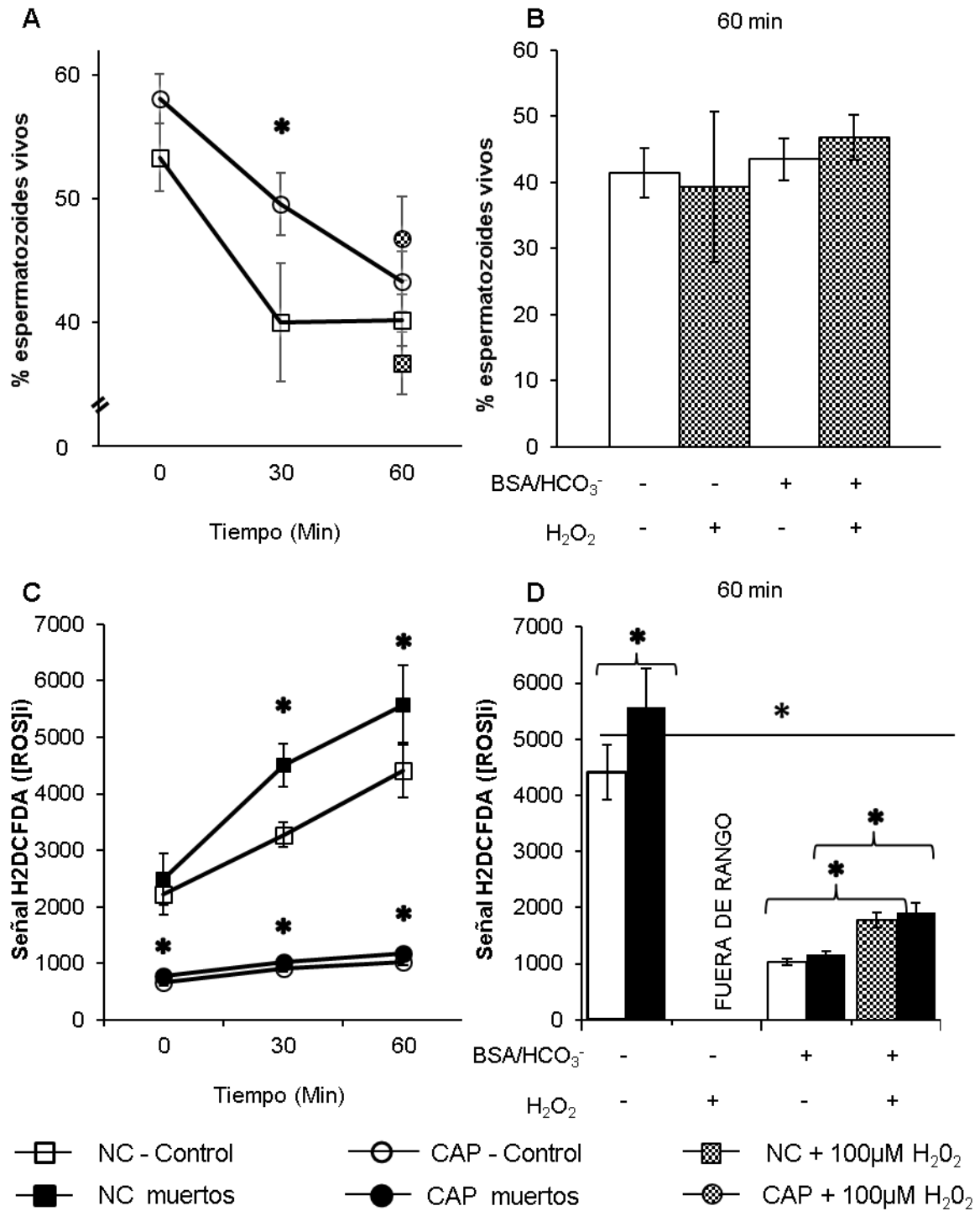
#### 8.3.1. Efecto del medio de supervivencia y del medio capacitante sobre la formación de ROS

En condiciones de supervivencia, el porcentaje de espermatozoides vivos disminuyó significativamente a los 30 min de incubación, mientras que, en condiciones capacitantes, la disminución fue más progresiva (**Fig. 8.1 A**). Este porcentaje fue mayor en los espermatozoides incubados en el medio CAP, respecto a aquellos incubados en NC, con diferencias significativas entre ambos medios, a los 30 min de la incubación. A los 60 min, el menor porcentaje de células vivas se observó en la muestra NC con 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, siendo aquella en condiciones capacitantes con 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la que presentó mayor porcentaje de células vivas. No se observaron diferencias significativas entre las cuatro muestras al final de la incubación (**Fig. 8.1 B**).

En ambos controles, se detectó un incremento significativo en la concentración intracelular de ROS a lo largo de la incubación, siendo más evidente en las muestras incubadas en medio de supervivencia (**Fig. 8.1 C**). A su vez, la [ROS]<sub>i</sub> fue significativamente superior en NC respecto a CAP en todos los tiempos

experimentales. En ambos medios, los espermatozoides vivos tuvieron menor [ROS]<sub>i</sub> que en las células muertas. En condiciones de supervivencia, estas diferencias fueron significativas a los 30 y 60 min de incubación, mientras que, en condiciones capacitantes, estas diferencias lo fueron a lo largo de la incubación (**Fig. 8.1 C, D**).

Al analizar a los 60 min de incubación la [ROS]<sub>i</sub> de las muestras incubadas en presencia o ausencia de 100  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se detectó un incremento significativo de la señal en ambos controles (**Fig. 8.1 D**). Éste fue mucho mayor en los espermatozoides del medio NC, superando la señal el límite de detección del citómetro. Estos niveles no se alcanzaron en ninguna otra muestra, de ninguna de las cinco series experimentales. En condiciones capacitantes, aumentó significativamente la [ROS]<sub>i</sub> tanto en las células vivas como en las muertas, respecto a CAPc (**Fig. 8.1 D**).

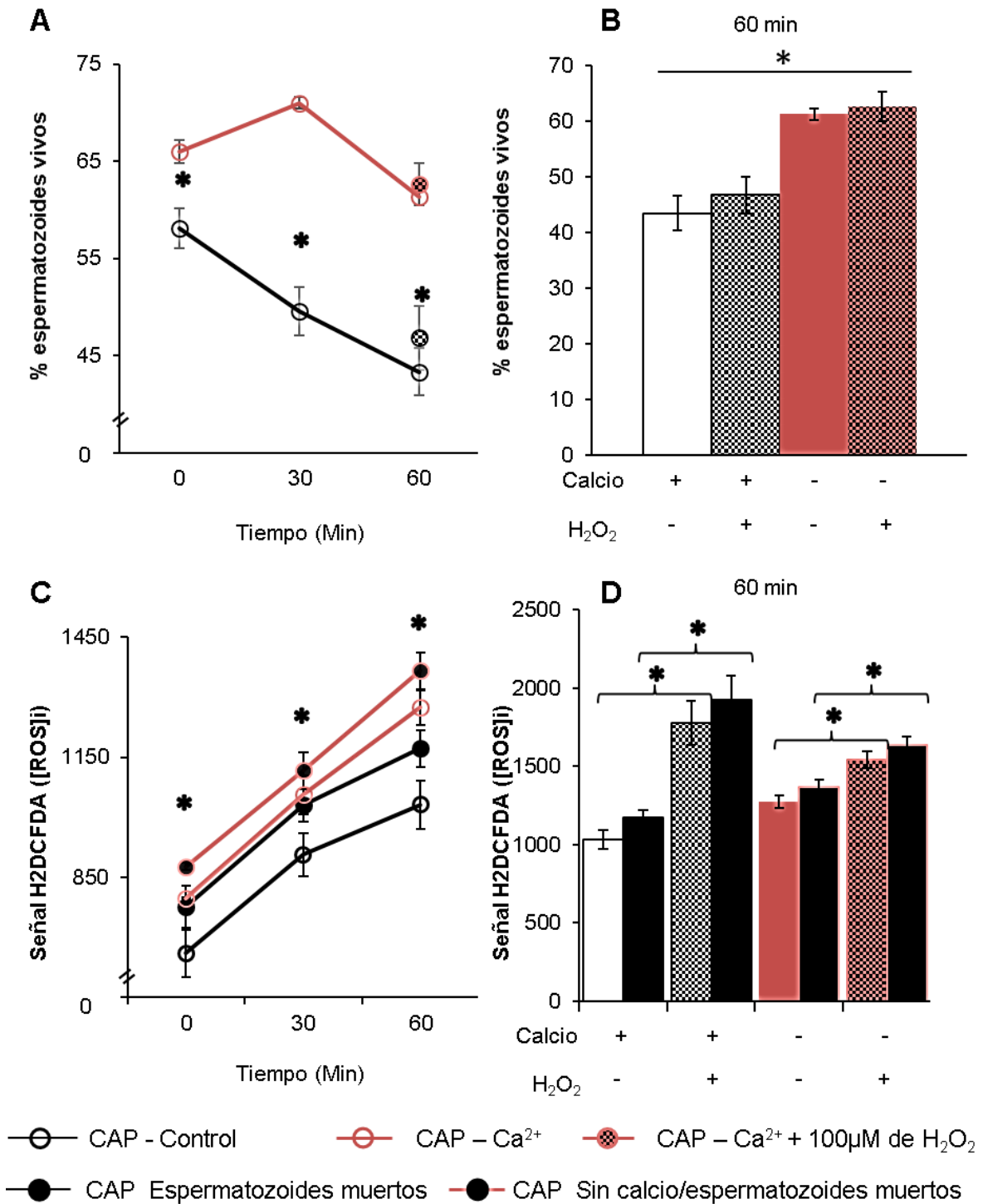


**Figura 8.1.** Porcentaje de los espermatozoides vivos a lo largo de la incubación (A) y al final de esta (B) en medio de supervivencia (NC, círculo) o capacitante (CAP, cuadrado). Concentración intracelular de ROS a lo largo de la incubación (C) y al final de esta (D) en medio NC y CAP, en presencia (cuadros negros) o ausencia de 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se diferencian los espermatozoides vivos (blanco) de los muertos (negro), de acuerdo con su respuesta frente a la sonda de muerte celular. Los gráficos representan la media ± SEM. Las diferencias significativas (p ≤ 0.05) de las muestras respecto a su control están indicadas por asteriscos. Nótese que por mantener un equilibrio de tamaño, las figuras no están a escala (véase la gradación del eje de ordenadas).

### 8.3.2. Efectos del calcio sobre la formación de ROS, en condiciones capacitantes

En todos los tiempos experimentales, las muestras incubadas en medio CAP sin calcio presentaron un porcentaje de células vivas significativamente superior al de CAPc (**Fig. 8.2 A**) y al del resto de las muestras (**Fig. 8.5**). Este porcentaje aumentó significativamente a los 30 min de incubación, disminuyendo al final de esta (**Fig. 8.2 A**). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células vivas por la presencia de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en las muestras incubadas sin calcio (**Fig. 8.2 A y B**).

La  $[\text{ROS}]_i$  de los espermatozoides incubados en medio CAP sin calcio fue aumentando significativamente a lo largo de toda la incubación, mostrando valores estadísticamente superiores a los de CAPc en todos los tiempos experimentales (**Fig. 8.2 C**). Al final de la incubación, estos espermatozoides tenían la mayor concentración de  $[\text{ROS}]_i$  de todas las muestras incubadas en condiciones capacitantes, pero con valores significativamente inferiores a los del NCc (**Fig. 8.5**). La  $[\text{ROS}]_i$  de las células vivas del medio sin calcio fue inferior a la de las células muertas, con diferencias significativas al inicio y al final de la incubación. Al añadir 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al medio, se detectó un incremento significativo de la  $[\text{ROS}]_i$  al final de la incubación, tanto en las células vivas, como en las muertas (**Fig. 8.2 D**). El incremento detectado y la  $[\text{ROS}]_i$ , fueron significativamente inferiores a los de los espermatozoides incubados en el medio CAPc con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Figura 8.2.** Porcentaje de espermatozoides vivos a lo largo de los 60 min incubación (A), y al final de ésta (B) en medio capacitante (CAP) en presencia (transparente) o ausencia (rojo) de calcio. Concentración intracelular de ROS a lo largo de la incubación (C) y al final de esta (D) en condiciones capacitantes, en presencia o ausencia de calcio y presencia (cuadros negros) o ausencia de 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se diferencian los espermatozoides vivos (blanco) de los muertos (negro) de acuerdo con su respuesta frente a la sonda de muerte celular. Los gráficos representan la media ± SEM. Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) de las muestras respecto a su control están indicadas mediante asteriscos. Nótese que por mantener un equilibrio de tamaño, las figuras no están a escala (véase la gradación del eje de ordenadas).

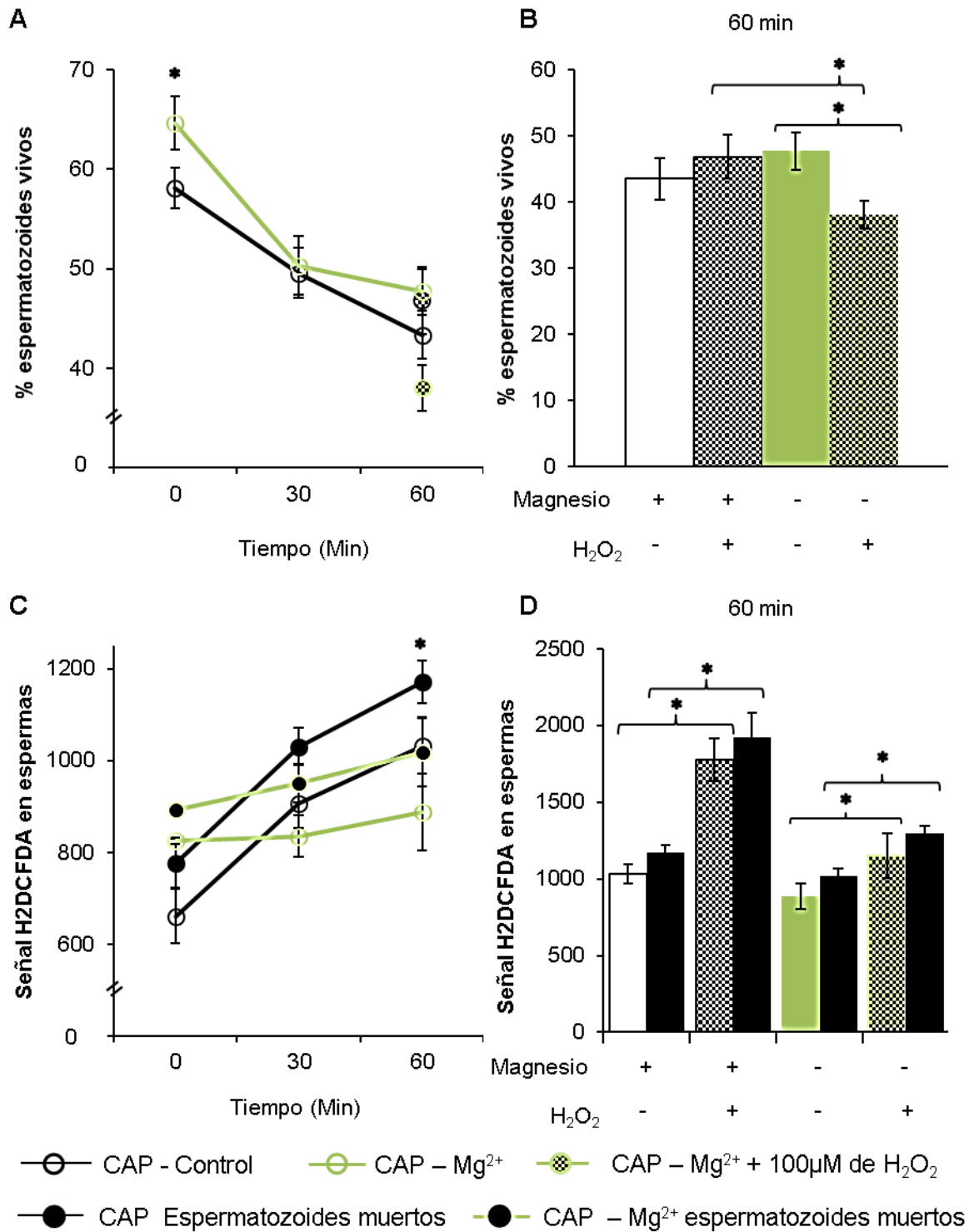


### 8.3.3. Efectos del magnesio sobre la formación de ROS, en condiciones capacitantes

Las muestras incubadas en medio CAP sin magnesio tuvieron una disminución significativa en el porcentaje de células vivas a lo largo de la incubación. Sólo se encontraron diferencias significativas respecto al control a los 15 min de incubación, cuando presentaron mayor porcentaje de células vivas en el medio sin magnesio (**Fig. 8.3 A**). Las muestras incubadas sin magnesio y con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , presentaron los menores valores de células vivas de todas las muestras incubadas en CAP, siendo significativamente inferior a los del CAPc y a los espermatozoides incubados sin magnesio (**Fig. 8.3 A, B y Fig. 8.5**).

Los espermatozoides incubados en el medio CAP sin magnesio, mostraron significativamente menos  $[\text{ROS}]_i$  que el resto de las muestras, desde el inicio de la incubación (**Fig. 8.5**). La  $[\text{ROS}]_i$  no sufrió variaciones a lo largo de la incubación, ni se detectaron grandes diferencias entre las células vivas y muertas de las muestras incubadas sin magnesio (**Fig. 8.3 C**). Al inicio de la incubación, las células vivas del medio sin magnesio tuvieron significativamente menos  $[\text{ROS}]_i$  que las células muertas, pero significativamente más que las células vivas del grupo control. Al final de la incubación, las células vivas presentaron la menor  $[\text{ROS}]_i$  de todas las muestras, y la de las células muertas fue significativamente inferior a la de las células muertas de CAPc (sin diferencias respecto a las células vivas del grupo control) (**Fig. 8.3 C**).

Al añadir 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al medio sin magnesio, se observó un incremento significativo de  $[\text{ROS}]_i$  en las células vivas y en las muertas (**Fig. 8.3 D**). Tanto el incremento como la  $[\text{ROS}]_i$ , fueron significativamente inferiores respecto al CAPc y al grupo incubado en medio CAP sin calcio (**Fig. 8.3 D y Fig. 8.5**).



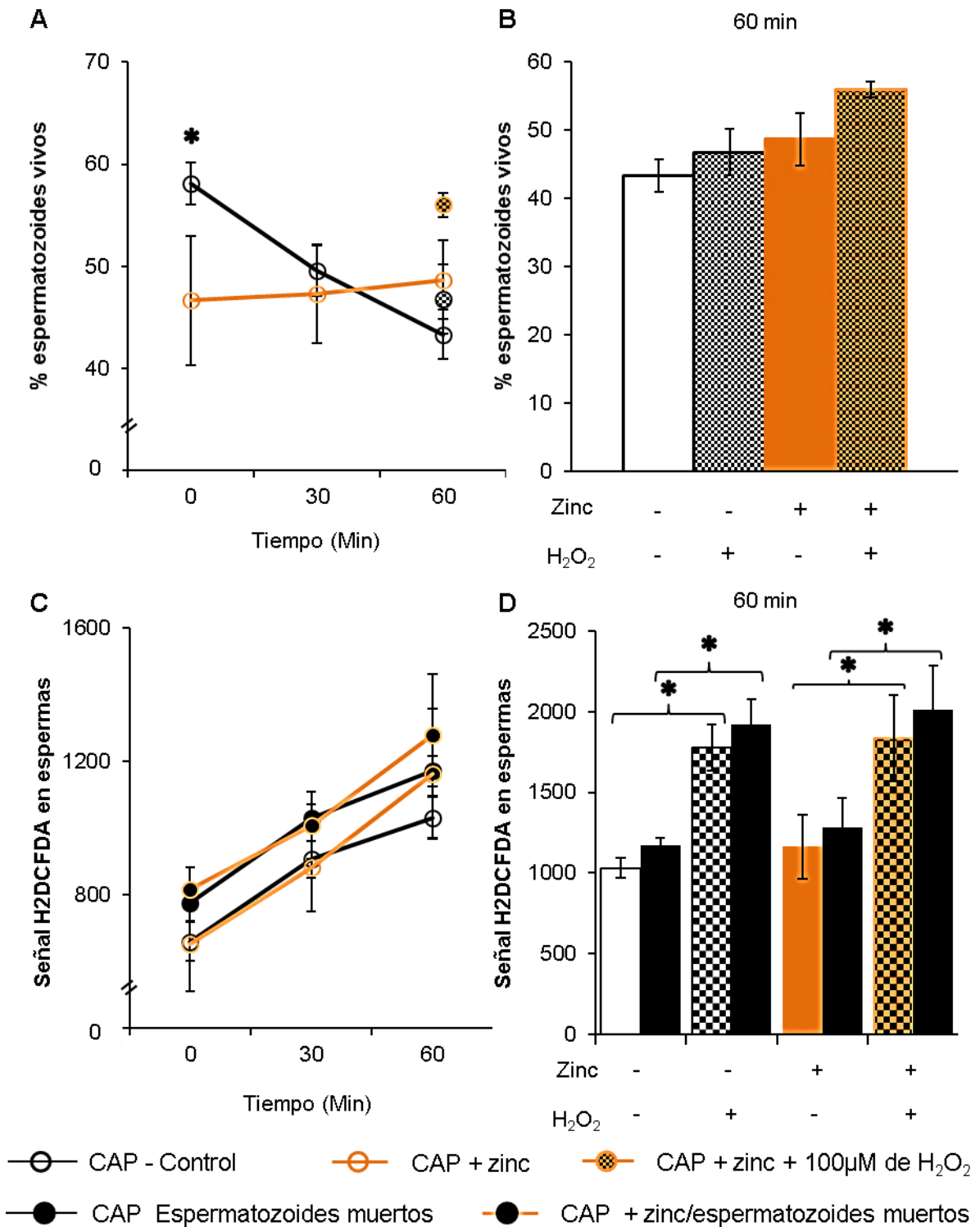
**Figura 8.3.** Porcentaje de espermatozoides vivos a lo largo de la incubación (A), y al final de ésta (B) en medio capacitante (CAP) en presencia (blanco) o ausencia (verde) de magnesio. Concentración intracelular de ROS a lo largo de la incubación (C) y al final de ésta (D) en condiciones capacitantes, en presencia o ausencia de magnesio y en presencia (cuadros negros) o ausencia de 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se diferencian los espermatozoides vivos (blanco) de los muertos (negro) de acuerdo con su respuesta frente a la sonda de muerte celular. Los gráficos representan la media ± SEM. Las diferencias significativas (p ≤ 0.05) de las muestras respecto a su control están indicadas mediante asteriscos. Nótese que por mantener un equilibrio de tamaño, las figuras no están a escala (véase la gradación del eje de ordenadas).

#### **8.3.4. Efectos del zinc sobre la formación de ROS, en condiciones capacitantes**

Las muestras incubadas en medio CAP en presencia de zinc presentaron menor porcentaje de células vivas que en el resto desde el inicio de la incubación (**Fig. 8.5**). Este tanto por ciento se mantuvo estable a lo largo de la incubación, sin diferencias significativas respecto al CAPc a partir de los 30 min (**Fig. 8.4 A**). En las muestras incubadas en medio CAP con zinc y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el porcentaje de células vivas aumentó significativamente respecto al grupo control (**Fig. 8.4 A y B**).

En las muestras incubadas en condiciones capacitantes con zinc, no se registraron diferencias de la [ROS]<sub>i</sub> respecto al grupo control (**Fig. 8.4 C**). Tampoco se observaron diferencias entre las células vivas y muertas. Al final de la incubación, se detectaron valores de [ROS]<sub>i</sub> superiores a los del control, tanto en las células vivas como en las muertas, sin ser estas diferencias significativas respecto al control (**Fig. 8.4 C**).

Las muestras con zinc y 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tuvieron un incremento significativo de la [ROS]<sub>i</sub>, sin diferencias estadísticas respecto al control (**Fig. 8.4 D**).



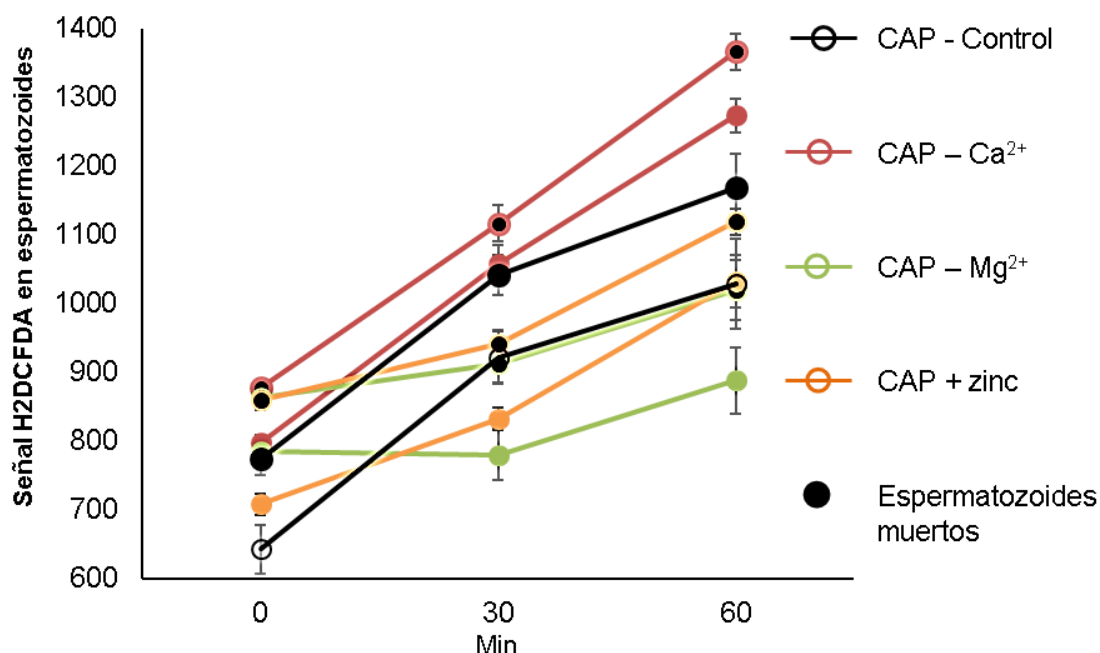
**Figura 8.4.** Porcentaje de espermatozoides vivos a lo largo de la incubación (A) y al final de ésta (B) en medio capacitante (CAP) en presencia (naranja) o ausencia (blanco) de zinc. Concentración intracelular de ROS a lo largo de la incubación (C) y al final de ésta (D) en condiciones capacitantes, en presencia o ausencia de zinc y presencia (cuadros negros) o ausencia de 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se diferencian los espermatozoides vivos (blanco) de los muertos (negro) de acuerdo con su respuesta frente a la sonda de muerte celular. Los gráficos representan la media ± SEM. Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) de las muestras respecto a su control están indicadas mediante asteriscos. Nótese que por mantener un equilibrio de tamaño, las figuras no están a escala (véase la gradación del eje de ordenadas).

**Tabla 8.2** Promedio  $\pm$  S.E.M de las variables de estudio.

Medio	Tratamiento	Tiempo (Min)	% células vivas	% células muertas	[ROS]i vivos	[ROS]i muertos	
NC	Control	0	54,5 $\pm$ 4,65	45,5 $\pm$ 4,65	2217,3 $\pm$ 350,92	2493,5 $\pm$ 459,79	
		30	40,8 $\pm$ 8,16	59,2 $\pm$ 8,16	3275,0 $\pm$ 217,27	4502,5 $\pm$ 386,76	
		60	41,5 $\pm$ 3,75	58,5 $\pm$ 3,75	4414,2 $\pm$ 484,31	5563,2 $\pm$ 703,51	
	+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	60	35,0 $\pm$ 11,38	65,0 $\pm$ 11,38	F.R.	F.R.	
		Control	0	58,6 $\pm$ 2,82	41,3 $\pm$ 2,79	660,4 $\pm$ 58,78	776,8 $\pm$ 53,09
			30	50,3 $\pm$ 3,20	49,8 $\pm$ 3,20	906,8 $\pm$ 53,99	1030,5 $\pm$ 41,13
60	43,5 $\pm$ 3,13		56,5 $\pm$ 3,13	1031,4 $\pm$ 61,06	1171,3 $\pm$ 45,91		
+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	60	48,7 $\pm$ 3,05	51,3 $\pm$ 3,05	1776,6 $\pm$ 140,84	1922,3 $\pm$ 155,71		
	- Ca <sup>2+</sup>	0	66,0 $\pm$ 1,41	34,0 $\pm$ 1,41	798,0 $\pm$ 3,21	877,0 $\pm$ 9,00	
		30	71,0 $\pm$ 0,71	29,0 $\pm$ 0,71	1057,0 $\pm$ 48,27	1116,3 $\pm$ 46,06	
60		61,3 $\pm$ 1,08	38,7 $\pm$ 1,08	1273,7 $\pm$ 42,67	1366,0 $\pm$ 46,20		
+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - Ca <sup>2+</sup>	60	62,7 $\pm$ 2,19	37,3 $\pm$ 2,19	1544,3 $\pm$ 54,93	1637,7 $\pm$ 49,44		
	- Mg <sup>2+</sup>	0	64,7 $\pm$ 3,34	35,3 $\pm$ 3,34	825,0 $\pm$ 7,35	891,5 $\pm$ 4,49	
		30	50,3 $\pm$ 3,56	49,7 $\pm$ 3,56	835,0 $\pm$ 44,91	950,5 $\pm$ 41,23	
60		47,7 $\pm$ 2,86	52,3 $\pm$ 2,86	888,0 $\pm$ 84,50	1019,0 $\pm$ 75,51		
+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - Mg <sup>2+</sup>	60	38,0 $\pm$ 1,73	62,0 $\pm$ 1,73	1147,5 $\pm$ 146,56	1292,5 $\pm$ 122,07		
	+ Zn <sup>2+</sup>	0	46,7 $\pm$ 6,33	53,3 $\pm$ 6,33	653,0 $\pm$ 140,63	817,7 $\pm$ 64,96	
		30	47,3 $\pm$ 4,81	52,7 $\pm$ 4,81	884,0 $\pm$ 134,43	1008,0 $\pm$ 101,20	
60		48,7 $\pm$ 3,84	51,3 $\pm$ 3,84	1162,3 $\pm$ 195,42	1280,0 $\pm$ 183,15		
+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Zn <sup>2+</sup>	60	56,7 $\pm$ 6,44	50,3 $\pm$ 6,44	1835,3 $\pm$ 266,03	2008,3 $\pm$ 278,87		

NC = Condiciones de supervivencia. CAP = Condiciones capacitantes.

Ca<sup>2+</sup>= Calcio. Mg<sup>2+</sup> = Magnesio. Zn<sup>2+</sup> = zinc. FR: Los valores quedaron fuera del rango superior de medida del citómetro de flujo. [ROS]i vivos = concentración de ROS en células vivas. [ROS]i muertos = concentración de ROS en células muertas.



**Fig. 8.5.** Representación de la [ROS]i de los espermatozoides vivos y muertos en los distintos medios de cultivo. NC = Condiciones de supervivencia. CAP = Condiciones capacitantes. Ca<sup>2+</sup>= Calcio. Mg<sup>2+</sup> = Magnesio. Zn<sup>2+</sup> = zinc.

## 9. DISCUSIÓN

---

En la presente tesis doctoral, se han estudiado los efectos de cationes como el calcio, magnesio y zinc, así como de los radicales libres (representados por el peróxido de hidrógeno) y de los antioxidantes (representados por la catalasa), sobre la funcionalidad espermática. Este estudio se ha realizado evaluando, de manera integrada, la movilidad y cinética espermática, el perfil de fosforilación de proteínas propio de la capacitación y el porcentaje de cada clase espermática. También se ha evaluado el efecto de dichos cationes y del proceso de la capacitación sobre la formación de radicales libres en el interior de espermatozoides sanos. Además, se han comparado dos fuentes de calcio, el carbonato cálcico amorfo sintético estabilizado con PBS, y el cloruro cálcico, evaluando las variables de la funcionalidad espermática de ratón *in vitro*.

Consideramos que el conjunto de estos estudios es, hasta la fecha, el primero de su clase, en tanto en cuanto estudia multiparamétricamente y de manera integrada, el efecto de diversos componentes de la funcionalidad espermática en base a la presencia o ausencia de diversos elementos del medio de cultivo.

### 9.1. El calcio y la funcionalidad espermática

El papel del calcio y el magnesio sobre la funcionalidad espermática ha sido estudiado por diversos autores. Algunas publicaciones sugieren la importancia de ambos metales alcalinos con diversos factores de la funcionalidad espermática como la movilidad, la cinética y el desarrollo de la capacitación (revisado en Márquez *et al.*, 2007; Valsa *et al.*, 2012; Bolanca *et al.*, 2016), siendo considerado el calcio como catión principal en la regulación de la capacitación, la hiperactivación y de la reacción acrosómica. Nuestros resultados son concluyentes y demuestran, de manera categórica, el papel de ambos cationes sobre la funcionalidad espermática, y su relación entre ellos.

El conjunto de nuestros estudios sobre el efecto del calcio en la funcionalidad espermática en ratón, se corresponden con las publicaciones que indican que este catión es necesario en la regulación de los procesos de movilidad y cinética espermática (Márquez *et al.*, 2007), en el desarrollo de la capacitación (Visconti, Moore, *et al.*, 1995; Visconti *et al.*, 2011; Brukman *et al.*, 2018), de la

hiperactivación (Ho y Suarez, 2001b, 2001b), de la reacción acrosómica (Witte y Schäfer-Somi, 2007), así como en otros aspectos de la funcionalidad espermática (Jaiswal y Conti, 2003; Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2006).

### **9.1.1. El calcio y la calidad espermática**

Nuestra investigación pone de manifiesto que, en ausencia de calcio, el porcentaje de espermatozoides vivos y vigorosos aumenta, sugiriendo cierto compromiso entre la funcionalidad espermática y la supervivencia celular, al menos en ratones. Esto es debido a que los espermatozoides están programados para fecundar al óvulo, y su supervivencia a largo plazo no es necesaria. Este compromiso ha sido observado por otros autores, en relación a la capacitación y movilidad en humanos y otros mamíferos (Aitken *et al.*, 2015).

### **9.1.2. El calcio y la cinética espermática**

En base a nuestros resultados, la ausencia de calcio hace que los espermatozoides de ratón desarrollen un movimiento más veloz y lineal, mostrando flagelos rígidos, con un batido flagelar más vigoroso y una amplitud del movimiento de la cabeza espermática menor, en los que, además, el desplazamiento se correlaciona con la trayectoria. Estas observaciones coinciden con las publicaciones de Suarez (2001), que describen que, al añadirse al medio de cultivo sustancias que liberan el calcio almacenado en las reservas espermáticas, el catión es llevado desde la cabeza y pieza media de los espermatozoides, hasta la pieza principal del flagelo, desarrollándose un movimiento flagelar amplio y asimétrico (Ho y Suarez, 2001a), similar al descrito para los espermatozoides hiperactivos (Yanagimachi, 1970).

Algunos parámetros de la cinética espermática estudiados durante la presente tesis doctoral, mostraron, a los 30 min de incubación en ausencia de calcio, variaciones significativas respecto al tiempo experimental anterior y posterior. Estos resultados son complementarios a los obtenidos por otros autores en ratones *knock-out* de *CatSper*, en los que los espermatozoides de dichos ratones conservaron su movilidad al inicio de la incubación en medio capacitante, mostrando velocidades similares al fenotipo salvaje, pero perdiendo la regulación

de la velocidad lineal, del componente direccional del movimiento y de la trayectoria a lo largo de la incubación (Qi *et al.*, 2007).

Nuestra explicación al conjunto de las observaciones indicadas anteriormente es, que los valores hallados en los primeros 30 min de incubación se deben al consumo, por parte de los espermatozoides, del calcio presente en el citoplasma y flagelo, lo que conduce a la ulterior pérdida de la movilidad. Subsiguientemente, en los ratones silvestres a diferencia de los *Knock-out*, se podría movilizar el calcio de los reservorios espermáticos, para permitir que se recuperase la movilidad, facilitando así el desplazamiento hacia un entorno rico en calcio, como el oviducto. Una vez allí, se podría captar el calcio del entorno, restableciéndose el resto de los eventos dependientes de este catión. Es decir, en ausencia de calcio intracelular, se destina el calcio de los reservorios espermáticos para favorecer la movilidad, a expensas de su uso para permitir los procesos de capacitación, hiperactivación y la reacción acrosómica.

Esta hipótesis, que sugiere una movilización “de emergencia” del calcio desde sus reservorios, también permite explicar los resultados obtenidos en los ensayos de incorporación de cationes tras 10 min de incubación en ausencia de calcio y magnesio, concretamente la recuperación de la movilidad tras la incorporación de magnesio (ver apartado 9.3.2). Conviene señalar en este punto que, en los espermatozoides incubados en ausencia de magnesio, no se observaron estas variaciones en los parámetros de la cinética espermática, tras los 30 min de la incubación. Además, no se detectó la recuperación del nado al incluir magnesio tras los 10 min de incubación en ausencia de ambos cationes. Estos resultados, en comparación con los del calcio, sugieren que no existen reservorios de magnesio, así como la importancia de disponibilidad de magnesio para la regulación de la cinética espermática que el calcio (ver apartado 9.3.2).

Son necesarios estudios en profundidad que relacionen el efecto de la concentración intraespermática de calcio con los procesos de la reacción acrosómica y la fecundación, así como es estudio de dicha regulación y su correlación con la concentración de magnesio.



### 9.1.3. El calcio y la capacitación

No hemos detectado el patrón propio de la capacitación en condiciones capacitantes en ausencia de calcio, pero sí al incubar a los espermatozoides en ausencia de calcio en presencia de su quelante. Estas observaciones coinciden con las de Navarrete (2015), en la detección de un papel dual del calcio, en el que, tanto en su ausencia, como en concentraciones fisiológicas del catión ocurre la fosforilación de proteínas propia de la capacitación (Navarrete *et al.*, 2015). A su vez, estos resultados se corresponden con nuestras observaciones sobre el porcentaje de cada clase espermática, y la disminución de espermatozoides hiperactivos en el medio de cultivo sin calcio, y su presencia en el medio sin el catión con EGTA 1 mM.

Dado que el papel bifásico del calcio también se ha descrito en la regulación de la hiperactivación (Chang y Suarez, 2011), creemos conveniente la realización de estudios considerando el efecto bifásico del calcio y su regulación de la funcionalidad espermática, para determinar si en ausencia del catión, y en presencia del quelante EGTA, la señalización celular que genera el patrón proteico propio de la capacitación, y la hiperactivación, también afecta, o no, a la reacción acrosómica, y si existen rutas de señalización aun no descubiertas.

### 9.1.4. El calcio y la hiperactivación

Nuestros resultados complementan las publicaciones que vinculan la ausencia de calcio tanto a un incremento de la linealidad del movimiento (Bolanca *et al.*, 2016), y a la ausencia de hiperactivación (Allouche-Fitoussi *et al.*, 2019), como aquellos en los que se relacionan bajas concentraciones del catión con mayor y mejor cinética del tipo progresivo en espermatozoides de diversas especies de mamíferos (Sørensen *et al.*, 1999) y humanos (Arver y Sjöberg, 1982; Prien *et al.*, 1990; Bolanca *et al.*, 2016). Estas observaciones se corresponden aquellas que señalan que, sin una fuente extracelular de calcio, o sin la capacidad de transportar el calcio intraespermático al flagelo (ratones *knock-out* para *CatSper*), los espermatozoides no muestran los patrones propios de la hiperactivación (Qi *et al.*, 2007; Suarez, 2008; Alasmari *et al.*, 2013).

En base a la bibliografía consultada y a nuestros resultados obtenidos, sugerimos que la incapacidad de los espermatozoides de hiperactivarse en ausencia de calcio puede deberse a: (1) consecuencia directa de la ausencia del proceso de la capacitación, en base a la teórica relación entre capacitación e hiperactivación o, (2) por la regulación del nado dependiente de calcio mediado por *CatSper*, y su relación con la hiperactivación.

Según las publicaciones de Pereira y colaboradores (2017), el incremento de calcio al atravesar el oviducto humano, induce la hiperactivación (Pereira *et al.*, 2017). En vista a nuestros resultados, concluimos que el calcio intracelular regula el movimiento flagelar, disminuyendo la linealidad y aumentando la frecuencia del batido flagelar, y la amplitud del movimiento lateral de la cabeza, lo que permite la coincidencia de la progresión espermática con el movimiento vigoroso y asimétrico de los espermatozoides hiperactivados.

También concluimos que la ausencia de calcio mejora el desplazamiento progresivo de los espermatozoides y su viabilidad, pero con consecuencias negativas para la fertilidad, ya que, en estas condiciones, no se puede desarrollar el movimiento hiperactivo, necesario tanto para el desplazamiento en el entorno viscoso del oviducto, como para el encuentro con el óvulo.

#### **9.1.5. El calcio y la producción de ROS durante la capacitación**

Una de las contribuciones más novedosas de nuestro estudio demuestra que, en condiciones capacitantes, pero en ausencia de calcio, la cantidad de ROS producidos por los espermatozoides es significativamente superior a la del control capacitante, que a su vez muestra menor producción de ROS que los espermatozoides incubados en el medio de supervivencia (ver apartado 9.6.1). Estas observaciones indican la necesidad del calcio para el desarrollo de la capacitación, así como la relación entre dicho proceso y el consumo (o no producción) de ROS en los espermatozoides.

#### **9.2. El carbonato cálcico amorfo y la funcionalidad espermática**

Los datos obtenidos al incubar espermatozoides con carbonato de calcio amorfo sintético, estabilizado con PBS (ACC), confirmaron nuestra propia investigación

sobre el papel del calcio en la funcionalidad espermática: Por un lado, al incubar con concentraciones de ACC inferiores a 1.2 mM, se obtuvieron resultados intermedios entre los del control y las muestras incubadas en ausencia del catión, tanto en condiciones de supervivencia como capacitantes. Por otro lado, al incubar en concentraciones de ACC próximas a 1.2 mM, se observaron variaciones en las distintas variables de la funcionalidad espermática similares a los obtenidos al incubar con 1.71 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Es decir, resultados de supervivencia espermática equivalentes, porcentajes de cada clase espermática sin diferencias significativas respecto a los controles, similares resultados de cinética espermática e idéntico perfil de proteínas fosforiladas propias del proceso de la capacitación, pero con menor concentración del catión.

Al obtenerse resultados equivalentes con menor concentración de la fuente de calcio, nuestros resultados indican que el carbonato cálcico amorfo tiene mejor biodisponibilidad que el  $\text{CaCl}_2$  como fuente de calcio en medios de cultivo espermáticos en ratón.

Al comparar el porcentaje de cada clase de espermatozoides, se observa que, a los 30 min de incubación con concentraciones equivalentes de calcio (1.71 mM  $\text{CaCl}_2$  o ACC), el porcentaje de espermatozoides hiperactivados fue mayor en las muestras incubadas con ACC, sin detectarse diferencias entre ambas fuentes de calcio al final de la incubación. Estos resultados señalan que el ACC sobre apresura el efecto del calcio sobre la cinética espermática, respecto al  $\text{CaCl}_2$ . Estas observaciones coinciden con las obtenidas al comparar las variaciones temporales de los parámetros de la cinética espermática entre cada fuente del catión, ya que la variación de cada variable a los 30 min de incubación en ACC fue similar al obtenido con  $\text{CaCl}_2$  a los 60 min.

Nuestros resultados sobre el perfil proteico de la capacitación sugieren que el ACC acelera el proceso de capacitación, ya que, a los 30 min de incubación, el patrón de proteínas de las muestras incubadas con más de 1.2 mM de ACC varió respecto a ambos controles de la capacitación, así como aumentó la señal relativa de pY de las muestras respecto al control capacitante.

Estos resultados coinciden con los análisis de cinética espermática descritos anteriormente, concluyéndose que el ACC muestra mayor farmacocinética y farmacodinámica que el  $\text{CaCl}_2$ , induciendo una respuesta temprana de la capacitación y de las modificaciones de la cinética espermática.

Asimismo, el ACC no mostró efectos perjudiciales para los espermatozoides, al no detectarse un aumento de la mortalidad o de la reacción acrosómica espontánea, ni pérdida de espermatozoides móviles o de la calidad del movimiento. Se debe tener en cuenta que, a los 30 min de incubación, el porcentaje de espermatozoides vivos sin acrosoma fue más alto en las muestras con 1.71 mM de ACC que en el control. No se observaron dichas diferencias al final de la incubación, lo que sugiere nuevamente el efecto de "aceleración de la capacitación" causada por el ACC.

Varias publicaciones aseguran que el ACC sintético en la fase acuosa es más estable y biodisponible que otras fuentes de calcio como el carbonato, y que no genera efectos adversos en otros tipos celulares (Meiron *et al.*, 2011; Shaltiel *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2014). La alta biodisponibilidad del ACC explica por qué a los 30 min de incubación en presencia de 1.71 mM de ACC, se obtienen más espermatozoides hiperactivados que el control, y un perfil proteico similar al del control al final de la incubación. Por lo tanto, asumimos que la biodisponibilidad de ACC facilita tanto la maquinaria de HA como el proceso de capacitación en espermatozoides de ratón, sin aumentar la AR espontánea.

Podemos concluir que el ACC es muy buena fuente de calcio para medios de cultivo de espermatozoides de ratón, al tener mayor biodisponibilidad, mayor farmacocinética y farmacodinámica que las fuentes de calcio habituales, sin generar efectos adversos sobre los mismos.

### **9.3.El magnesio y la funcionalidad espermática**

Se ha descrito que el calcio y el magnesio tienen una función antagónica en la regulación de las células somáticas, debido a ello, hubiéramos esperado que el magnesio hubiera generado un efecto opuesto al del calcio en los medios de cultivo de espermatozoides de ratón. Sin embargo, no hemos tenido evidencias de que el magnesio tenga efectos sobre la viabilidad espermática o la

señalización celular propia de la capacitación, pero sí efectos opuestos y complementarios en la regulación de la cinética espermática, y con el porcentaje de espermatozoides intermedios e hiperactivos.

### **9.3.1. El magnesio y la capacitación**

Dado a las publicaciones que relacionan concentraciones controladas de radicales libres con la inducción de la capacitación de los espermatozoides de ratones y humanos (Griveau *et al.*, 1994; O'Flaherty *et al.*, 2005; O'Flaherty *et al.*, 2006a; Aitken, 2017), y al ser el magnesio un elemento relacionado con el sistema antioxidante por ser un cofactor de la superóxido dismutasa (Floreani *et al.*, 2002; O'Flaherty *et al.*, 2006b; Aboua *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012), los resultados esperados hubieran sido que, la ausencia de magnesio, facilitase el desarrollo del patrón capacitante. Sin embargo, nuestros resultados no evidencian relación entre el magnesio y la capacitación, ya que la ausencia del catión no altera el patrón de fosforilación propio de la capacitación en condiciones de supervivencia, ni la acelera en condiciones capacitantes.

Nuestras observaciones confirman estudios previos en los que, al tratar de compensar la ausencia de calcio de un medio de cultivo capacitante con otros cationes divalentes como el magnesio, no se consiguió suplir el efecto del calcio en los procesos de la funcionalidad espermática estudiados en la presente tesis. En dicho estudio, el magnesio y otros cationes, no consiguieron soportar la capacitación, la hiperactivación ni la reacción acrosómica (Stock y Fraser, 1989).

### **9.3.2. El magnesio y la cinética espermática**

Nuestras observaciones revelan que, en ausencia de magnesio, el movimiento del conjunto de los espermatozoides es espástico, lineal e ineficaz, mostrando variaciones respecto al control, en el porcentaje de cada clase espermática. Estos resultados coinciden con los publicados por otros autores, en los que, en ausencia de calcio o de magnesio, los parámetros de cinética espermática obtenidos, se alejan de los valores propios de los espermatozoides intermedios e hiperactivos (Mortimer, 2000; Goodson *et al.*, 2011).

Dado que no se ha evidenciado ninguna relación entre el magnesio y la capacitación, la explicación a estas observaciones es que, la ausencia del catión altera los parámetros de la cinética espermática, de manera que gran parte de los espermatozoides se clasifica como progresivos. Por ejemplo, en nuestros análisis, los espermatozoides incubados en medio capacitante sin magnesio mostraron parámetros de cinética espermática con valores próximos a los de los progresivos incubados en el medio control.

Estas observaciones señalan la importancia del magnesio en la regulación de la cinética espermática y su efecto sobre el desarrollo del movimiento hiperactivado, y la aparición de espermatozoides hiperactivados del tipo estrella (ver apartado 9.5.4. sobre la hiperactivación y su relación con los ROS).

No obstante, algunos autores no han encontrado relación entre el magnesio presente en el líquido seminal y la movilidad (Fakih *et al.*, 1986; Hashemi *et al.*, 2018), la supervivencia (Lindholmer y Eliasson, 1974), y otros elementos de la funcionalidad espermática en espermatozoides de humanos (Sørensen *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 2001; Valsa *et al.*, 2012, 2015, 2016; Kasperczyk *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2016) ni de otras especies de mamíferos (Babaknejad *et al.*, 2018). Muy probablemente la discrepancia entre los resultados de dichas publicaciones con los de la presente tesis doctoral se deba fundamentalmente a que en dichas investigaciones se relacionan el contacto de los espermatozoides con el magnesio del líquido seminal, mientras que nuestras investigaciones se centran en el efecto del catión durante toda la incubación en condiciones capacitantes. Además, parte de dichas discrepancias pueden deberse a haberse realizado los estudios en distintas especies de mamíferos.

Al comparar los resultados de nuestras investigaciones sobre el papel del calcio y el magnesio sobre la cinética espermática, podemos observar que, en ausencia de magnesio y presencia de EGTA, los componentes principales de la velocidad tuvieron más variación que en ausencia de calcio, con o sin el quelante. Esto nos permite destacar la importancia del magnesio frente al calcio exógeno en la regulación de la movilidad. Estos resultados son innovadores ya que el autor no ha encontrado, a fecha de entrega de la presente tesis doctoral, publicaciones que profundicen en la relación del magnesio con la cinética de espermatozoides

de ratón, ni investigaciones a nivel molecular, que expliquen cómo el magnesio modula los distintos parámetros de natación espermática.

Hemos investigado si en ausencia de calcio y magnesio, la adición posterior de alguno de los dos cationes permitía el restablecimiento de la movilidad. Nuestros análisis revelaron que, a diferencia del calcio, la adición de 1.2 mM de magnesio en el medio de cultivo, tras 10 min de incubación en ausencia de ambos cationes, permitía la recuperación de la natación espermática. Una posible explicación a estas observaciones es que la adición del magnesio permita el restablecimiento del movimiento de los espermatozoides, debido a que éstos movilizan el calcio de sus reservorios, complementando la regulación de la motilidad. Además, dado que no se observa dicha recuperación cuando se añade calcio, concluimos que ambos cationes son fundamentales para la movilidad de los espermatozoides de ratón, pero que, al no disponer de reservorios de magnesio, los gametos masculinos, en ausencia del catión, se detienen. Son necesarios estudios sobre la movilización del calcio en el interior de este tipo celular, en presencia y ausencia de magnesio, así como estudios a nivel molecular sobre el efecto del magnesio sobre la movilidad espermática.

Teniendo en cuenta el conjunto de datos obtenidos en nuestros estudios, sobre la relación del calcio y el magnesio con la funcionalidad espermática, podemos concluir que ambos cationes son imprescindibles para el desarrollo del movimiento hiperactivado. Además, dichos metales tienen un papel complementario sobre la cinética espermática, ya que el calcio muestra mayor correlación sobre la velocidad y linealidad, mientras que el magnesio regula el ritmo del batido flagelar, la trayectoria del desplazamiento, y permite un movimiento rectilíneo adecuado. Este hecho es, posiblemente, el efecto más próximo al papel antagónico del calcio y el magnesio observado en la regulación de las células somáticas de mamíferos. Por lo tanto, podemos concluir que, en espermatozoides de ratón, la regulación del calcio y del magnesio sobre la cinética, es complementaria.

#### 9.4. El zinc y la funcionalidad espermática

Respecto al tercer metal en estudio, la bibliografía indica que el zinc es un metal necesario para el desarrollo de la espermatogénesis, y que los varones con dieta pobre en zinc, tienen baja calidad espermática (Riffo *et al.*, 1992; Andrews *et al.*, 1994; Michailov *et al.*, 2014; Hadj Ali *et al.*, 2018).

##### 9.4.1. El zinc y la formación de agregados espermáticos

Nuestras observaciones más relevantes en relación con el efecto del zinc sobre la funcionalidad de espermatozoides son aquellas vinculadas al efecto del metal sobre la formación de agregados celulares y *trenes*.

Como se indicó en el punto 1.1.1 de la introducción, los *trenes* espermáticos, son una agrupación progresiva y funcional de hasta 20-50 espermatozoides que se unen a través de la cabeza espermática y nadan de manera sincronizada hasta desarrollar el movimiento hiperactivo (Immler *et al.*, 2007; Firman y Simmons, 2009), estando relacionado con la presión selectiva de la competencia espermática, derivada ésta de la poliandria (Breed, 2005; Firman y Simmons, 2009). Se ha especulado que la formación de estas agrupaciones se realiza a través del gancho espermático, situado en la región acrosómica (Breed, 2005; Firman y Simmons, 2009), sin embargo, recientemente se ha demostrado una correlación entre la morfometría del gancho y la competencia espermática como una mejora de la hidrodinámica de la natación de los espermatozoides (Gómez Montoto *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2013; Varea-Sánchez *et al.*, 2016; Tourmente *et al.*, 2019), sin relación con la formación de agregados espermáticos (Tourmente *et al.*, 2016). Además, algunos roedores con espermatozoides sin gancho forman *trenes*, descartándose que esta estructura intervenga en la formación de agregados espermáticos, sin dar explicación a la formación de dichas agrupaciones.

Basándonos en la bibliografía disponible sobre el papel del zinc en la unión y comunicación celular de las células somáticas, podemos asumir que la capacidad de agregación espermática está basada en estructuras de dedos de zinc y otros elementos de unión celular dependientes del zinc, tanto de la membrana plasmática como del entorno (Vallee y Falchuk, 1993; Fallah *et al.*,



2018). Es muy probable que entre dichos elementos de unión celular estén implicados la semenogelina y sus fragmentos de degradación, ya que son elementos que tienen una elevada afinidad por el zinc y por la superficie espermática, sirviendo como elementos de anclaje a multitud de proteínas como la fibronectina, la proteína inhibidora de la proteína C, heparina, CD52, eppin (SPINLWI), lactotransferrina y clusterina, y siendo además sustrato de diversas enzimas como transglutaminasas, PKA y PKC, cuyos niveles, como los de zinc, varían a lo largo del proceso de la capacitación (Colagar *et al.*, 2009; de Lamirande y Lamothe, 2010; Hadj Ali *et al.*, 2018).

El papel del zinc como elemento de unión entre espermatozoides puede explicar nuestras observaciones, en las que las muestras con altas concentraciones del metal, o de su quelante, forman agregados espermáticos. Por un lado, al aumentar la presencia de zinc en el medio de incubación, los elementos de agrupación celular tales como los dedos de zinc y la semenogelina, tienen mayor capacidad de unirse al zinc circundante y, por lo tanto, de generar agregados espermáticos tipo *trenes*. Por otro lado, en los medios sin zinc y con TPEN, la unión del quelante al zinc presente en la membrana plasmática de diversos espermatozoides sirve de conexión entre ellos, de manera similar a como lo hace el metal, pero sin ser capaz de generar la coordinación espermática propia de los *trenes*. Son necesarios más estudios a nivel molecular para comprender los dominios de membrana asociados a la formación de dichos agregados, así como la relación de estos elementos con la evolución de los espermatozoides generada en base a la presión selectiva de la competición espermática. También son necesarios estudios de señalización celular que expliquen cómo los espermatozoides que forman parte de los *trenes* sincronizan su batido flagelar.

#### **9.4.2. El zinc y la capacitación**

Algunas publicaciones señalan que el zinc es capaz de prevenir la capacitación humana, al inhibir la producción de ion superóxido y de óxido nítrico, a través del efecto de la semenogelina (de Lamirande *et al.*, 2009; de Lamirande y Lamothe, 2010) y de SOD. También apuntan a que el quelante TPEN es capaz de inducir la capacitación de los espermatozoides humanos, al causar el incremento de especies reactivas endógenas (de Lamirande *et al.*, 2009).

No hemos observado variaciones en el perfil proteico típico de la capacitación debidas a la concentración de zinc, o de TPEN, confirmando las publicaciones que rechazan que el zinc tenga efecto anti-capacitante en espermatozoides de hámster o ratón (Riffo *et al.*, 1992; Andrews *et al.*, 1994). Además, en base a nuestros resultados, no existe relación entre la presencia del metal, con la cantidad de ROS intracelular (ver apartado 9.6.4).

#### **9.4.3. El zinc, la cinética espermática y la hiperactivación**

La bibliografía muestra controversia respecto al efecto del zinc sobre la cinética espermática, atribuyéndole al metal diversos efectos en función del parámetro analizado y la especie estudiada. En nuestra experimentación hemos observado un incremento en el porcentaje de espermatozoides progresivos, así como en la velocidad espermática, pero una disminución en la linealidad del movimiento, debidos a pequeñas concentraciones de zinc (entre 10 y 50  $\mu\text{M}$ ).

Nuestras observaciones coinciden con las publicaciones que evidencian una correlación negativa moderada entre la presencia de elevadas concentraciones de zinc en el flagelo, y la movilidad global y progresiva de los espermatozoides humanos (Bittner *et al.*, 1999). Estos autores consideran que la depleción del zinc, mediante el empleo de determinados quelantes, conduce a un aumento de la velocidad lineal promedio, y de la movilidad progresiva de los espermatozoides, al tiempo que disminuye el porcentaje de espermatozoides hiperactivos (Wroblewski *et al.*, 2003).

Estos autores sugieren que la eliminación del zinc causa el endurecimiento de las fibras densas externas del flagelo, lo que aumenta su rigidez, ocasionando el incremento de la movilidad lineal y progresiva. Igualmente, estudios posteriores relacionan la movilidad espermática con el canal Hv1, siendo el zinc un represor de la hiperactivación (Kerns, Zigo y Sutovsky, 2018).

Sin embargo, otros autores consideran que en el tracto reproductor femenino, los espermatozoides humanos están expuestos a concentraciones de zinc de entre 1.0 y 1.5  $\mu\text{M}$  (Ménézo *et al.*, 2011), siendo ésta una concentración suficiente para estimular la hiperactivación de espermatozoides *in vitro*. Recientes publicaciones señalan que 30  $\mu\text{M}$  de zinc, induce la hiperactivación

mediante la cascada GPR39 - AC – cAMP - PKA – Src – EGFR - fosfolipasa C - *CatSper* (Allouche-Fitoussi *et al.*, 2019), sugiriendo que, en condiciones fisiológicas en el tracto reproductivo femenino, el zinc actúa como un regulador positivo de la capacitación e hiperactivación. Además, se ha demostrado que en el oviducto humano, el zinc se encuentra a concentraciones superiores a los 50  $\mu\text{M}$ , y permite el desarrollo de la reacción acrosómica (Michailov *et al.*, 2014), mientras que esas concentraciones inhiben la capacitación en los espermatozoides recién eyaculados (de Lamirande *et al.*, 2009).

Teniendo en cuenta la bibliografía, consideramos que las discrepancias encontradas en las distintas investigaciones se deben a que, en los espermatozoides humanos, el zinc tiene un papel bifásico en el control de la cinética espermática y de la hiperactivación, dependiendo de la fase de la capacitación en la que se encuentren. Estas conclusiones se basan en los estudios de Kerns *et al.* (2018) y Cotrim *et al.* (2019) que demuestran que existen patrones de ubicación y concentración del zinc intraespermático, asociados a las distintas fases de la capacitación de los espermatozoides humanos (Kerns *et al.*, 2018; Cotrim *et al.*, 2019).

Esta hipótesis puede explicar nuestras observaciones sobre el porcentaje de cada clase espermática y las variaciones obtenidas en los parámetros de su cinética: Cada muestra analizada tuvo una única concentración de zinc a lo largo de toda la incubación *in vitro*, es decir, sin variaciones temporales del metal a lo largo del proceso de la capacitación. En estas condiciones, las muestras con concentraciones menores del metal permitieron el desarrollo fisiológico de la movilidad espermática, mientras que en las muestras con concentraciones superiores se bloqueó el proceso de la hiperactivación. Nuestros resultados coinciden con las publicaciones que indican que el zinc tiene un efecto inhibitorio del movimiento hiperactivado, aumentando el porcentaje de espermatozoides progresivos (Bittner *et al.*, 1999; Kerns *et al.*, 2018) y con aquellas en las que se indica que la eliminación del zinc aumenta la linealidad del movimiento (Wroblewski *et al.*, 2003) y progresivo.

Nuestros resultados también coinciden con la publicación de Foresta *et al.* (2014), que señala que la presencia de 1 mM de zinc durante el *swim-out* y las

posteriores incubaciones *in vitro* de espermatozoides humanos, disminuye el porcentaje de espermatozoides activos e hiperactivos, sin que se vea afectado el porcentaje de células vivas, o el desarrollo de la capacitación o de la reacción acrosómica (Foresta *et al.*, 2014).

Además del posible papel bifásico del zinc en la regulación de la funcionalidad espermática, todos estos resultados pueden explicarse por efecto de la presencia de *trenes* en el medio: teniendo en cuenta que el zinc interviene en la formación de *trenes*, y que éstos se separan durante el desarrollo de la hiperactivación, cabe esperar que la regulación del zinc sobre la cinética espermática sea facilitadora de dichos agregados, y contraria al desarrollo de la hiperactivación. Además, debido a la formación de los *trenes*, es posible que los resultados de cinética espermática estén sesgados, al ser posible evaluar únicamente los espermatozoides libres de las muestras examinadas, que tienen mayor movimiento progresivo y lineal debido al efecto del zinc sobre la movilidad espermática, sin contarse aquellos formando parte de los *trenes*. Esto explicaría el descenso de espermatozoides hiperactivados en presencia de zinc, y el movimiento más lineal en las muestras con 10  $\mu\text{M}$  del metal.

Todas las observaciones realizadas en nuestros estudios sobre la relación entre cationes y la funcionalidad espermática en espermatozoides de ratón, fueron similares a las descritas por Bolanca y colaboradores sobre la relación entre el calcio, zinc, cobre y magnesio en relación a la cinética de espermatozoides humanos (Bolanca *et al.*, 2016).

### **9.5. Los ROS y la funcionalidad espermática**

Nuestra investigación integrada sobre el efecto de los ROS y la catalasa sobre la movilidad, cinética, hiperactivación y capacitación de espermatozoides de ratón revelan datos novedosos.

#### **9.5.1. ROS y el proceso de la capacitación**

Nuestra investigación descarta que los ROS tengan capacidad de estimular el proceso de capacitación, al no ser capaz de inducirla en medios de supervivencia suplementados, o no, con bicarbonato sódico o albúmina. Tampoco hemos

detectado que los ROS causen la aceleración de los eventos de la capacitación en condiciones capacitantes. Además, no hemos detectado un retraso o inhibición de la capacitación en medio suplementado con catalasa.

Estas observaciones son opuestas a las publicaciones que sugieren que las especies reactivas son capaces de inducir la capacitación de espermatozoides de los mamíferos (Herrero *et al.*, 2000; O'Flaherty *et al.*, 2006b; O'Flaherty, 2015), incluidos los humanos (Griveau *et al.*, 1994; Aitken *et al.*, 1997; Du Plessis *et al.*, 2015), cerdo (Awda *et al.*, 2009), bovinos (O'Flaherty *et al.*, 2005; O'Flaherty *et al.*, 2006a; Roy y Atreya, 2008a), hámster (Bize *et al.*, 1991), ratas (Lewis y Aitken, 2001) y ratones (Ecroyd *et al.*, 2003).

En la publicación de Ecroyd y colaboradores (2003), se estudia la relación entre la concentración de AMPc y la cantidad de ROS en el interior de los espermatozoides de ratón, tras 180 min de incubación en condiciones capacitantes (Ecroyd *et al.*, 2003). Esta investigación muestra una disminución progresiva de AMPc entre los 0 y 60 min de incubación, y un incremento de ROS a los 40 min. Además, sugiere que la presencia de 3000 U/mL de catalasa produce una disminución de la fosforilación de proteínas respecto al control. Sin embargo, en nuestros resultados no hemos obtenido indicios de relación entre la catalasa y la fosforilación de proteínas propias de la capacitación, ni entre la concentración intracelular de ROS y ningún parámetro de la capacitación. En base a la bibliografía y a nuestros resultados, concluimos que son las variaciones de AMPc detectadas en la investigación de Ecroyd, entre los 0 y 60 min de incubación, las responsables de inducir la activación de PKA, sin tener vinculación con el incremento de los ROS.

En nuestros estudios, la presencia de radicales libres o antioxidantes no causaron diferencias respecto a sus controles, en el perfil proteico propio de la capacitación. Además, la presencia de bicarbonato sódico en medio TYH sin albúmina, generó un perfil proteico de pPKA y pY distinto al de NCc y al de CAPc, tal y como fue descrito anteriormente (Battistone *et al.*, 2013). El perfil obtenido en estas condiciones no se vio afectado por la presencia de concentraciones crecientes de ROS. Por lo tanto, podemos concluir que el perfil proteico propio de la capacitación *in vitro* ocurre exclusivamente en presencia de calcio,

bicarbonato sódico y BSA, sin que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno ocasione cambios en el perfil de proteínas fosforiladas por PKA, y sin que se desarrolle la cascada de fosforilación en residuos de tirosina.

Dado que en nuestra investigación se evalúa la adición de ROS exógenos, y se estudian distintas variables del proceso de capacitación y del medio de cultivo, concluimos que los ROS no están implicados en el desarrollo de la capacitación, si bien la cantidad de ROS producidos por los espermatozoides sí está relacionada con el proceso capacitante (ver sección 9.6).

### **9.5.2. Los antioxidantes y la funcionalidad espermiática**

En caso de que los ROS fueran inductores de la capacitación, se esperaría que el efecto de la catalasa sobre la funcionalidad espermiática fuera antagónico al de los ROS, tal como se ha observado en espermatozoides humanos (Aitken, Paterson, *et al.*, 1995; Leclerc *et al.*, 1997) y de ratón (Ecroyd *et al.*, 2003).

Diversas investigaciones sobre espermatozoides de algunos mamíferos como toro, caballo, ciervo y ratón señalan que incubar espermatozoides sanos con antioxidantes como catalasa y superóxido dismutasa, mejora la calidad espermiática, en términos de viabilidad, calidad del ADN y reacción acrosómica (revisado en Chi *et al.*, 2008; Mohammadzadeh *et al.*, 2019). Además, la catalasa genera un efecto positivo sobre la cinética, viabilidad e integridad espermiática, especialmente en espermatozoides humanos criopreservados (Moubasher *et al.*, 2013). Otras publicaciones indican que se pueden mejorar las técnicas de reproducción asistida al incubar a los espermatozoides humanos con dicha enzima, pues ésta protege la cromatina, mejora la calidad espermiática (Mohammadzadeh *et al.*, 2019) y evita la reacción acrosómica.

Todas estas observaciones, junto con nuestros resultados, indican que los antioxidantes tienen efectos positivos sobre la funcionalidad espermiática, lo que permite sugerir que los ROS tienen un efecto antagónico (Walczak–Jedrzejowska *et al.*, 2013; Moghbeli *et al.*, 2016). Nuestros resultados están respaldados con las publicaciones anteriormente citadas, al no haberse evidenciado variaciones importantes en el proceso de la capacitación debidas a

la catalasa (alteración del perfil proteico propio de la capacitación), pero si mostrando beneficios sobre la cinética espermática.

### **9.5.3. Efecto de los ROS y de la catalasa sobre la cinética espermática**

Nuestro estudio del efecto de los radicales libres sobre la cinética espermática, reveló un incremento de espermatozoides hiperactivos asociado a la presencia de ROS, con independencia de si se incubaba en condiciones de supervivencia o capacitantes, y del perfil proteico de la capacitación de las muestras. Sin embargo, no se detectaron variaciones importantes en los parámetros de la velocidad espermática debidos a los ROS, pero sí en aquellos de la trayectoria, al aumentar la rectitud del movimiento y la amplitud de la oscilación. Tanto en condiciones de supervivencia como capacitantes, la catalasa causó el incremento de la velocidad de los espermatozoides progresivos e intermedios, y generó valores de linealidad y oscilación mayores en los espermatozoides progresivos e hiperactivos. Todas estas observaciones contradicen a las de Aboua *et al.* (2009) para espermatozoides humanos, que detectan un incremento en el porcentaje de espermatozoides estáticos, con disminución de los progresivos y de la velocidad en concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 2.5, 7.5 y 15 μM (Aboua *et al.*, 2009). Estas diferencias pueden deberse a la especie de estudio, y a que estos tratamientos fueron efectuados en condiciones capacitante, mientras que los nuestros fueron en condiciones de supervivencia.

### **9.5.4. Los ROS y el movimiento hiperactivado**

Las publicaciones de Aitken *et al.* (1997, 2001 y 2003), sobre la inducción del proceso de la capacitación mediante ROS, se centran en el incremento en el porcentaje de espermatozoides hiperactivos en condiciones de supervivencia en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno.

Nuestras observaciones del efecto de los ROS sobre cada clase espermática sugieren que 30-50 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tiene un efecto inductor de la hiperactivación. Además, este efecto se detecta también en las muestras con menor cantidad de ROS exógenos, probablemente debido a la acumulación de ROS endógenos. Nuestros resultados sugieren que existe una desregulación del proceso debido

a los ROS. En ninguno de los casos se observaron alteraciones en el perfil proteico de la capacitación.

Una explicación para el incremento de espermatozoides hiperactivos ante los ROS exógenos, independiente del desarrollo de la capacitación, se basa en nuestros resultados sobre el efecto del magnesio y de los ROS sobre la cinética espermática: Tanto en el medio de supervivencia como en el capacitante, la ausencia de magnesio o la incubación con ROS exógenos, provocó la aparición de espermatozoides con valores de cinética espermática similares a los de los espermatozoides hiperactivos de los controles capacitantes. Hemos denominado a este movimiento como “*tipo hiperactivado*”, el cual se caracteriza por dibujar con su trayectoria “ochos y lazos” tanto en el programa CEROS como en el SCA, y por mostrar gran amplitud de movimiento lateral, pérdida en la linealidad del desplazamiento y de la trayectoria, coincidiendo con lo descrito para los espermatozoides HA “tipo estrella” en la bibliografía (Yanagimachi, 1970; Mortimer, 2000; Goodson *et al.*, 2011).

Este movimiento puede ser considerado como un *falso positivo* de los sistemas automáticos de análisis espermático, que clasifica como hiperactivos aquellos que no lo son realmente. Esto justifica el incremento de esta clase espermática, sin verse un desarrollo del perfil proteico propio de la capacitación. Las posibles explicaciones al este movimiento *tipo hiperactivado*, observadas en ausencia de magnesio o en presencia de altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno, se detallan a continuación:

(1) Daño oxidativo por incremento de los ROS intracelulares, debido a la disminución de la actividad de la enzima superóxido dismutasa dependiente de magnesio (Rasool *et al.*, 2014), o al exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógenos. Todo ello podría activar una hipotética vía de señalización alternativa inductora de la capacitación, aun no descrita (Aitken *et al.*, 1998; Ford, 2004; Aitken, 2017). En base a nuestros resultados obtenidos sobre el efecto de los ROS en la capacitación, y a nuestros análisis del perfil proteico mediante *western-blot*, descartamos que los ROS generen variaciones en la señalización celular reguladora de la capacitación, ni ocasionen el incremento de espermatozoides hiperactivos.



(2) En vista de nuestros resultados, el magnesio regula la linealidad del movimiento espermático, y en su ausencia, los espermatozoides muestran movimientos amplios y pocos progresivos. Esto evidencia que el magnesio puede actuar como modificador de la hiperactivación y, por lo tanto, en su ausencia la hiperactivación se desarrolla de forma incompleta. Si bien la bibliografía consultada ofrece evidencias de la relación entre el magnesio y la hiperactivación, hacen falta estudios moleculares en profundidad, que examinen las vías de señalización de la hiperactivación, para sostener esta hipótesis.

(3) Que la existencia de dos tipos de movimientos hiperactivados, dependientes de las señales del calcio, descritos por Chang y Suarez (2011), también involucre al magnesio. Según estos autores, el antibiótico *Timerosal* induce la liberación del calcio de sus reservorios espermáticos, produciendo un movimiento hiperactivo en el que el batido flagelar se genera en sentido contrario al gancho, mientras que la hiperactivación común, inducida con transportadores de calcio, y por el incremento intracelular del pH, tienen un batido flagelar orientado hacia el gancho (Chang y Suarez, 2011). Según estos autores ambos tipos de movimiento hiperactivo, están relacionados con la fosforilación de proteínas en residuos de serotonina/treonina propios de la capacitación (Márquez y Suarez, 2004; Márquez *et al.*, 2007; Suarez, 2008; Chang y Suarez, 2010, 2011). Teniendo en cuenta las analogías entre el calcio y el magnesio en relación a la regulación de la función espermática, y la existencia de dos vías de señalización del proceso, dependientes de la presencia de calcio en el espermatozoide (Navarrete *et al.*, 2015), sugerimos que con el magnesio puede ocurrir algo similar. Proponemos que, tanto en ausencia absoluta de magnesio, como en su presencia en condiciones fisiológicas, se activan “vías de hiperactivación alternativas”, que ocasionan el movimiento *tipo hiperactivado*.

(4) Que el estrés oxidativo generado en las condiciones anteriormente mencionadas, cause daño en la membrana plasmática o altere a los reguladores de la cinética espermática, modificando el patrón de movilidad (Aitken *et al.*, 1996, 2014; Baumber *et al.*, 2000). Esta hipótesis se apoya en los estudios del efecto del estrés oxidativo en la calidad espermática, que muestran cómo el exceso de ROS causa efectos deletéreos sobre las membranas plasmáticas y alteración en el nado de los espermatozoides (delBarco-Trillo *et al.*, 2016).

Las variaciones de los componentes de la cinética espermática debidas a los ROS de nuestros resultados, coinciden con el incremento de la clase hiperactiva, ya que mientras que a los 60 min de incubación en presencia de ROS no se detectan variaciones importantes en los parámetros de la cinética espermática, a los 90 min de incubación con concentraciones de ROS superiores a los 30  $\mu\text{M}$ , se obtienen resultados próximos a los de los espermatozoides hiperactivos, tanto en medio capacitante, como en condiciones de supervivencia.

Teniendo en cuenta todos estos resultados, podemos concluir que los ROS no son capaces de inducir la capacitación en espermatozoides de ratón, y que el incremento de espermatozoides hiperactivos observados en las muestras incubadas en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  exógeno y en ausencia de magnesio, se debe al daño oxidativo de los ROS sobre la membrana plasmática de los mismos, que genera alternaciones en el nado de los espermatozoides, aproximándolos a un movimiento “*tipo hiperactivado*”.

## **9.6. Producción de ROS por los espermatozoides**

Una vez descartado el papel de los ROS como inductores de la capacitación, se estudió la relación de la capacitación con la producción intracelular de ROS, en las diversas condiciones experimentales de la tesis: condiciones de supervivencia o capacitante, presencia o ausencia de calcio, magnesio, zinc y  $\text{H}_2\text{O}_2$  exógeno en el medio, etc. Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no existe ningún estudio que relacione dichos componentes con la producción de ROS endógeno, lo que destaca el carácter novedoso de este estudio.

### **9.6.1. La capacitación y la producción de ROS**

Nuestros estudios de citometría han identificado un incremento del  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracelular a lo largo de la incubación, siendo mayor el incremento en condiciones de supervivencia que en medio capacitante. Estas observaciones coinciden con aquellas publicadas sobre espermatozoides de carnero (Peris-Frau et al., 2019). Dadas las características del diseño experimental, en las que la suspensión espermática está libre de otros tejidos, espermatozoides inmaduros o de células del sistema inmune, es poco probable que el incremento de  $\text{H}_2\text{O}_2$  observado en el interior celular, se deba a elementos del entorno, sino

que tiene que deberse a los propios espermatozoides en los que se mide dicha producción de ROS. Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que los espermatozoides de ratón son capaces de producir ROS en condiciones fisiológicas, quedando pendiente discernir si dicha producción es de origen mitocondrial o citoesquelética, así como su relación con la movilidad y la respiración celular de los espermatozoides.

Nuestras observaciones indican que, el incremento de los ROS endógenos es mayor en condiciones de supervivencia que en condiciones capacitantes. Es posible que los componentes propios del medio capacitante (BSA o el bicarbonato sódico), tengan cierto efecto antioxidante o bloqueante de la señal del H<sub>2</sub>DCFDA: Según el fabricante y la bibliografía consultada, la sonda citométrica se ve afectada por algunos de los componentes propios del medio capacitante, como son la albúmina o el piruvato sódico, que son considerados antioxidantes capaces de competir por diversos ROS. Esto podría reducir la señal del H<sub>2</sub>DCFDA oxidado. Además, el rojo fenol puede ser capaz de causar interferencias en la señal de dicha sonda. Tanto el piruvato, como el rojo de fenol y la gentamicina, no fueron incorporados en la elaboración de ambos medios de cultivo, con el objetivo de desarrollar los ensayos citométricos sin interferencias. Sin embargo, como la BSA es un elemento imprescindible para la capacitación, no pudo ser excluido del medio capacitante para este estudio.

Según la bibliografía (Gallardo-Montoya, 2007; López-Rodríguez y Suárez-Dieguez, 2010; Arroyo y Fernández, 2012), la capacidad antioxidante de la BSA en espermatozoides de ratón, no es lo suficientemente grande como para reducir de manera tan abrupta señal detectada. Hay que tener en cuenta los resultados obtenidos en medio capacitante en ausencia de calcio, y que la pendiente de la recta es mayor en el medio de supervivencia respecto al control capacitante, en el que la cantidad de BSA es constante y, por tanto, sin posibilidad de aumentar su capacidad antioxidativa. Por ello, el total de la diferencia de señal entre ambos controles no puede explicarse únicamente por el efecto de la albúmina.

Otra posible explicación es que, en condiciones capacitantes, se dificulte el contacto entre la sonda y los ROS intracelulares. Esta dificultad puede deberse a que la desorganización de la membrana plasmática debida a la capacitación

permita mayor difusión libre del  $H_2O_2$  fuera de la célula, no pudiendo ser detectado por las sondas citométricas en el interior celular, justificando la diferencia de la señal obtenida entre ambos controles.

Nuestros resultados contradicen la hipótesis que indica que la capacitación y la apoptosis son procesos relacionados, ya que considera que la “sobrecapacitación de los espermatozoides por acumulación de ROS, induce la apoptosis de los espermatozoides humanos, por desensamblaje de la cadena respiratoria, activación de las caspasas y la peroxidación lipídica” (Aitken *et al.*, 2015). Según nuestros resultados, las células muertas tienen significativamente mayor cantidad de ROS que las células vivas, sin embargo, las células muertas del medio capacitante tienen significativamente menos ROS que las células incubadas en condiciones de supervivencia, vivas o muertas, lo que pone en duda la hipótesis de Aitken y colaboradores. Además, nuestros resultados indican que, en condiciones de supervivencia, el porcentaje de células vivas es menor que en medio capacitante, sugiriendo que la capacitación optimiza el funcionamiento celular y su supervivencia.

Son necesarios nuevos estudios de tipo molecular, que relacionen la cantidad de ROS necesaria para reducir al 50% la viabilidad espermática en ambos medios de cultivo, y el efecto de dicha concentración celular sobre las distintas estructuras celulares, como son la membrana y las mitocondrias, así como sobre los eventos de señalización celular de la capacitación.

### **9.6.2. El calcio y la producción de ROS**

La ausencia de calcio en el medio capacitante presentó un mayor porcentaje de células vivas, y un mayor incremento de la concentración de los ROS endógenos respecto al control capacitante. Considerando que, en ausencia de calcio no se desarrolla la capacitación ni la hiperactivación, se esperaban valores de ROS similares a los del control de supervivencia, de manera que el incremento detectado al añadir  $H_2O_2$  exógeno fuera superior al del control capacitante. No obstante, este incremento fue menor que el observado en condiciones de supervivencia, y al añadir ROS exógenos, el aumento de la señal de la sonda fue menor que la del control tras añadirle el  $H_2O_2$ .

Una explicación a estas observaciones es, que la señal observada al incubar en el medio capacitante sin calcio sea la señal propia de los espermatozoides no capacitados ni hiperactivados presentes en un medio con BSA. Ello sugiere que la diferencia entre los ROS detectados en el control de supervivencia y los detectados en el medio capacitante sin calcio, se deba a la capacidad antioxidante de la BSA. Esta diferencia es equivalente a la variación de la cantidad de ROS intracelular entre ambos controles, explicada por las condiciones capacitantes (optimización de la célula tras des-represión, o difusión libre de los ROS fuera de la célula, tras la reorganización celular).

Otra explicación es que, los cambios que ocurren en condiciones capacitantes independientes del calcio, como son los cambios en la membrana plasmática, cambios proteicos y cambios metabólicos, disminuyan la cantidad de ROS presente en las células, por optimización de la célula al des-reprimirse, o por la difusión libre de los ROS a través de la membrana plasmática de los espermatozoides des-reprimidos, justificando así que la señal obtenida en el medio capacitante sin calcio sea intermedia entre ambos controles.

### **9.6.3. El magnesio y la producción de ROS**

Debido a la actividad antioxidante dependiente de magnesio, los resultados esperados sobre la cantidad de ROS en los espermatozoides incubados en medio capacitante sin este catión predecían la detección de un incremento de ROS superior en este medio que en el control capacitante. Sin embargo, los ROS generados en las muestras sin magnesio, fueron significativamente menores a los del control, en las muestras incubadas en medio capacitante sin magnesio, en presencia o ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno.

Considerando que los espermatozoides incubados en el medio sin magnesio sí muestran el perfil proteico propio de la capacitación y desarrollan la hiperactivación, la explicación más plausible estará relacionada con la movilidad espermática. Como se indicó anteriormente, el movimiento de los espermatozoides incubados en medio capacitante sin magnesio es espástico y muy lineal en el caso de los espermatozoides progresivos, y espástico y espiralizado en el caso de los hiperactivados. Sugerimos que, al tener un

movimiento interrumpido, la producción de ROS también lo sea, presentando concentraciones de ROS intracelular más bajas.

También podemos asumir que la actividad antioxidativa dependiente de magnesio se adquiere durante la espermatogénesis, y no depende de la cantidad del catión presente a lo largo de la incubación, y que esta actividad antioxidante es muy pequeña y no significativa, en vista de las diferencias obtenidas entre la muestra sin magnesio y el control capacitante. Se requieren más estudios que relacionen el metabolismo de los espermatozoides con la producción de ROS y su relación con el magnesio. No podemos explicar por qué en condiciones capacitantes sin el magnesio, el incremento de señal obtenido es menor que el ocurrido en el control capacitante.

#### **9.6.4. El zinc y la producción de ROS**

Se hubiera esperado que los espermatozoides incubados en condiciones capacitantes suplementados con zinc no mostraran un incremento muy elevado de ROS, ni durante la incubación, ni en presencia de ROS exógenos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas respecto al control capacitante en ninguno de los dos casos. Estos resultados, juntos con los del magnesio, nos permiten determinar que el papel de la enzima superóxido dismutasa dependiente de magnesio o de zinc, es insignificante, respecto a la totalidad del sistema antioxidante de los espermatozoides de ratón.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, podemos indicar que, de los elementos estudiados sobre la funcionalidad espermática, el calcio es el elemento que más influye sobre la regulación de la movilidad espermática, siendo imprescindible para el desarrollo de la capacitación, la adquisición del movimiento hiperactivo y para la reacción acrosómica. En segundo lugar, se encontraría el magnesio, siendo un catión de gran importancia en la regulación de la cinética espermática, pero sin relación aparente con la capacitación o el desarrollo de la hiperactivación.

El zinc interviene principalmente regulando la agregación espermática, sin ser imprescindible para la funcionalidad espermática, pues no tiene gran relevancia

sobre la viabilidad, la calidad espermática, la cinética espermática, la hiperactivación ni sobre la capacitación.

Por su parte, los ROS en general, y el ion superóxido y el peróxido de hidrógeno en particular, no tienen un efecto notable como reguladores de la capacitación. Sin embargo, su acumulación progresiva, especialmente en condiciones de supervivencia, tiene un efecto negativo sobre la funcionalidad espermática, al causar daños oxidativos a nivel de la membrana capaces de alterar la movilidad espermática y la viabilidad.

El debate sobre la relación entre el proceso de la capacitación y el desarrollo de la hiperactivación sigue abierto, existiendo múltiples publicaciones que, si bien consideran que la hiperactivación no es parte de la capacitación, sí que sugieren una vinculación entre ambos procesos; que la capacitación prepare la maquinaria que genera la hiperactivación, o que los receptores y efectores del proceso queden expuestos a las señales que lo activen (Mortimer y Mortimer, 1990; de Lamirande y Gagnon, 1993b; de Lamirande *et al.*, 1997; Si, 1999; Ho y Suarez, 2001a; Allouche-Fitoussi *et al.*, 2019). A lo largo de todos nuestros experimentos, no hemos detectado ningún resultado que justifique la desvinculación entre los procesos de la hiperactivación y de la capacitación, ya que cuando uno de los eventos quedaba inhibido o desarrollado, el otro también (por ejemplo, en ausencia de calcio o bicarbonato). Por esta razón, nuestros resultados contribuyen a este debate, indicando que ambos procesos están relacionados, y se desarrolla la hiperactivación como parte del proceso de la capacitación, o al menos requiere de esta para su desarrollo.

Es necesario profundizar más en el estudio del papel del calcio, zinc, magnesio y los ROS sobre la capacidad de los espermatozoides de reconocer y fecundar al óvulo, así como un estudio en profundidad, a nivel molecular, para revelar de manera más concreta qué proteínas y elementos celulares vinculan al magnesio con la regulación de la cinética espermática. También necesitamos esclarecer a nivel molecular el papel del zinc en la formación de agregados espermáticos, y la capacidad de coordinación entre los espermatozoides que forman los *trenes* espermáticos.

## 10. CONCLUSIONES

---

Las conclusiones presentadas a continuación se refieren al organismo utilizado en este estudio, los espermatozoides de ratón, por lo que la extrapolación a otras especies deberá realizarse con cautela.

1. El calcio es necesario para la funcionalidad espermática, al ser imprescindible para el desarrollo de la capacitación, la hiperactivación y la reacción acrosómica.
2. El calcio es muy importante en la regulación de la cinética espermática, modulando la velocidad y disminuyendo la linealidad y rectitud del movimiento, permitiendo el desarrollo de la hiperactivación.
3. El carbonato cálcico amorfo es mejor fuente de calcio que el cloruro cálcico en la incubación de espermatozoides de ratón *in vitro*, al acelerar y facilitar los eventos de la capacitación y a la hiperactivación, sin efectos dañinos.
4. El magnesio no tiene relación con los procesos de la capacitación o la hiperactivación, pero es fundamental en la regulación de la trayectoria espermática.
5. En los espermatozoides de ratón, el calcio y el magnesio no tienen funciones opuestas, si no que son complementarias a nivel de la cinética espermática.
6. El zinc no interviene de manera importante en la regulación de la funcionalidad espermática, pero es imprescindible en la formación de agregados espermáticos y *trenes*.
7. La evaluación de la cinética espermática en cada clase espermática aporta información más clara y concisa que cuando se realizado sobre el conjunto de los espermatozoides.



## CONCLUSIONES

8. El proceso de la capacitación está relacionado con el desarrollo de la hiperactivación, en tanto en cuanto ninguna de las variaciones experimentales ha conducido al desarrollo de un evento en ausencia del otro.
9. En presencia de altas concentraciones de ROS exógenos, así como en ausencia de magnesio, se desarrolla un movimiento "*tipo hiperactivado*" en estrella, que tiene relación con el daño oxidativo sobre los espermatozoides.
10. Los espermatozoides son capaces de producir ROS, acumulándolos en su interior principalmente en condiciones no capacitantes, cuando la des-represión de la funcionalidad espermática y la reorganización de la membrana plasmática no es completa.
11. Los ROS no son capaces de inducir o favorecer la capacitación en los espermatozoides, pero sí existe una relación entre la capacitación y la producción de ROS en el interior de éstos.
12. La actividad antioxidante de la enzima superóxido dismutasa dependiente de zinc o del magnesio, es ínfima en comparación con la cantidad de ROS producidos en condiciones capacitantes.

## 10. CONCLUSIONS

---

The conclusions presented below refer to the organism used in this study, mouse sperm, so extrapolation to other species should be carried out with caution.

1. Calcium is necessary for sperm function, as it is essential for the development of capacitation, hyperactivation and acrosome reaction.
2. Calcium is very important in the regulation of sperm kinetics, modulating velocity and decreasing the linearity and straightness of movement, allowing the development of hyperactivation.
3. Amorphous calcium carbonate is a better source of calcium than calcium chloride in the incubation of mouse spermatozoa *in vitro*, by accelerating and facilitating capacitation events and hyperactivation, without harmful effects.
4. Magnesium is not related to the processes of capacitation or hyperactivation, but it is essential in the regulation of the sperm trajectory.
5. In mouse sperm, calcium and magnesium do not have opposite functions, but are complementary at the level of sperm kinetics.
6. Zinc does not play a significant role in the regulation of sperm function, but it is essential in the formation of sperm aggregates and spermatid trains.
7. The evaluation of sperm kinetics in each sperm class provides clearer and more concise information than when it was carried out on all sperm.
8. The capacitation process is related to the development of hyperactivation since none of the experimental variations has led to the development of one event in the absence of the other.

## CONCLUSIONES

9. In the presence of high concentrations of exogenous ROS, as well as in the absence of magnesium, a star-like “hyperactivated like” movement develops, which is related to the oxidative damage on sperm.
10. Spermatozoa can produce ROS, accumulating inside them mainly under non-capacitating conditions, when the de-repression of sperm function and the reorganization of the plasma membrane is not complete.
11. ROS are not capable of inducing or favoring sperm capacitation, but there is a relationship between this process and the concentration of ROS detectable within the sperm.
12. The antioxidant activity of the zinc- or magnesium-dependent enzyme superoxide dismutase is negligible compared to the amount of ROS produced under capacitating conditions.

## 11. BIBLIOGRAFIA

---

- Abou-haila, A. y Tulsiani, D. R. P. (2009) «Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction», *Archives of biochemistry and biophysics*, 485(1), pp. 72-81. doi: 10.1016/j.abb.2009.02.003.
- Aboua, Y. G., du Plessis, S. S., Reichgelt, P. y Brooks, N. (2009) «The in vitro effects of superoxide, some commercially available antioxidants and red palm oil on sperm motility», *Asian journal of andrology*, 11(6), pp. 695-702. doi: 10.1038/aja.2009.55.
- Achikanu, C., Correia, J., Guidobaldi, H. A., Giojalas, L. C., Barratt, C. L. R., Da Silva, S. M. y Publicover, S. (2019) «Continuous behavioural “switching” in human spermatozoa and its regulation by Ca<sup>2+</sup>-mobilising stimuli», *Molecular Human Reproduction*. Oxford University Press, 25(8), pp. 423-432. doi: 10.1093/molehr/gaz034.
- Adeoya-Osiguwa, S. A. y Fraser, L. R. (1993) «A biphasic pattern of 45Ca<sup>2+</sup> uptake by mouse spermatozoa in vitro correlates with changing functional potential», *Journal of reproduction and fertility*, 99(1), pp. 187-94. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8283437>
- Ahmed, T., Islam, R., Lone, F. A. y Malik, A. A. (2016) «Effect of washing on the post-thaw quality of cryopreserved ram epididymal spermatozoa», *Veterinary World*, 9(5), pp. 519-523. doi: 10.14202/vetworld.2016.519-523.
- Aitken, R. J., Buckingham, D. W., Brindle, J., Gomez, E., Baker, H. W. y Irvine, D. S. (1995) «Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma.», *Human reproduction (Oxford, England)*, 10(8), pp. 2061-71. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8567843>
- Aitken, R. J., Paterson, M., Fisher, H., Buckingham, D. W. y van Duin, M. (1995) «Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function.», *Journal of cell science*, 108 ( Pt 5, pp. 2017-25. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7544800>
- Aitken, R. J., Fisher, H. M., Fulton, N., Gomez, E., Knox, W., Lewis, B. y Irvine, S. (1997) «Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine.», *Molecular reproduction and development*, 47(4), pp. 468-82. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199708)47:4<468::AID-MRD14>3.0.CO;2-S.
- Aitken, R. J., Harkiss, D., Knox, W., Paterson, M. y Irvine, D. S. (1998) «A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation.», *Journal of cell science*, 111 ( Pt 5, pp. 645-56. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9454738>
- Aitken, R. J., Wingate, J. K., De Iuliis, G. N., Koppers, A. J. y McLaughlin, E. A. (2006) «Cis-unsaturated fatty acids stimulate reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in human spermatozoa.», *Journal of clinic endocrinology*, 91, pp. 4154–4163.
- Aitken, R. J., Smith, T. B., Jobling, M. S., Baker, M. A. y De Iuliis, G. N. (2014) «Oxidative stress and male reproductive health», *Asian journal of andrology*, 16(1), pp. 31-8. doi: 10.4103/1008-682X.122203.

## BIBLIOGRAFIA

- Aitken, R. J. (2017) «Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage», *Molecular reproduction and development*. doi: 10.1002/mrd.22871.
- Aitken, R. J., Baker, M. A. y Nixon, B. (2015) «Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress?», *Asian journal of andrology*, 17(4), pp. 633-9. doi: 10.4103/1008-682X.153850.
- Aitken, R. J., Baker, M. A. y O'Bryan, M. (2004) «Shedding light on chemiluminescence: the application of chemiluminescence in diagnostic andrology», *Journal of andrology*, 25, pp. 455-465.
- Aitken, R. J. y Clarkson, J. (1987) «Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa», *Journal of reproduction and fertility*.
- Aitken, R. J. y Clarkson, J. (1988) «Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques», *Journal of andrology*, 9, pp. 367-376.
- Aitken, R. J., Clarkson, J. y Fishel, S. (1989) «Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function», *Biology of Reproduction*, 41, pp. 183-197.
- Aitken, R. J. y Fisher, H. M. (1994) «Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk», *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 16, pp. 259-267.
- Aitken, R. J., Irvine, D. S. y Wu, F. C. (1991) «Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility», *American journal of Obstetrics and Gynecology*, 64, pp. 542-551.
- Aitken, R. J., Jones, K. T. y Robertson, S. A. (1996) «Reactive oxygen species and sperm function--in sickness and in health.», *Journal of andrology*, 33(6), pp. 1096-106. doi: 10.2164/jandrol.112.016535.
- Aitken RJ, R. S. (2008) «Antioxidant systems and oxidative stress in the testes.», *Oxid Med Cell Longev*, 1(1), pp. 15-24. doi: 10.4161/oxim.1.1.6843.
- Aizenberg, J., Addadi, L., Weiner, S. y Lambert, G. (1996) «Stabilization of amorphous calcium carbonate by specialized macromolecules in biological and synthetic precipitates», *Advanced Materials. WILEY-VCH Verlag GmbH*, 8(3), pp. 222-226. doi: 10.1002/adma.19960080307.
- Akingbemi, B. (2005) «Estrogen regulation of testicular function.», *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 3, pp. 51-64. doi: 10.1186/1477-7827-3-51.
- Alasmari, W., Costello, S., Correia, J., Oxenham, S. K., Morris, J., Fernandes, L., Ramalho-Santos, J., Kirkman-Brown, J., Michelangeli, F., Publicover, S. y Barratt, C. L. R. (2013) «Ca<sup>2+</sup> Signals Generated by CatSper and Ca<sup>2+</sup> Stores Regulate Different Behaviors in Human Sperm», *Journal of Biological Chemistry*, 288(9), pp. 6248-6258. doi: 10.1074/jbc.M112.439356.
- Al Alawi, A. M., Majoni, S. W. y Falhammar, H. (2018) «Magnesium and Human Health: Perspectives and Research Directions», *International Journal of Endocrinology*, 2018, pp. 1-17. doi: 10.1155/2018/9041694.

## BIBLIOGRAFIA

Alipour, F., Jalali, M., Nikraves, M. R., Fazel, A., Sankian, M. y Khordad, E. (2018) «Assessment of sperm morphology, chromatin integrity, and catSper genes expression in hypothyroid mice», *Acta Biologica Hungarica*, 69(3), pp. 244-258. doi: 10.1556/018.68.2018.3.2.

Allouche-Fitoussi, D., Bakhshi, D. y Breitbart, H. (2019) «Signaling pathways involved in human sperm hyperactivated motility stimulated by Zn<sup>2+</sup>», *Molecular Reproduction and Development*, 85(6), pp. 543-556. doi: 10.1002/mrd.22996.

Alonge, S., Melandri, M., Leoci, R., Lacalandra, G., Caira, M. y Aiudi, G. (2019) «The Effect of Dietary Supplementation of Vitamin E, Selenium, Zinc, Folic Acid, and N-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Sperm Motility and Membrane Properties in Dogs», *Animals*, 9(2), p. 34. doi: 10.3390/ani9020034.

Alvarez-Fernandez, A., Borziak, K., McDonald, G. C., Dorus, S. y Pizzari, T. (2019) «Female novelty and male status dynamically modulate ejaculate expenditure and seminal fluid proteome over successive matings in red junglefowl», *Scientific Reports*, 9(1), p. 5852. doi: 10.1038/s41598-019-41336-5.

Alvarez, J. G., Touchstone, J., Blasco, L. y Storey, B. T. (1987) «Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxidase dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity.», *Journal of andrology*, 6, pp. 333-335.

Alvarez, J. G. y Storey, B. T. (1989) «Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation», *Gamete Research*, 23(1), pp. 77-90. doi: 10.1002/mrd.1120230108.

Amann, R. P. y Waberski, D. (2014) «Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments», *Theriogenology*. Elsevier Inc, 81(1), pp. 5-17. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.004.

Amaral, A., Lourenço, B., Marques, M. y Ramalho-Santos, J. (2013) «Mitochondria functionality and sperm quality.», *Reproduction (Cambridge, England)*, 146(5), pp. R163-74. doi: 10.1530/REP-13-0178.

Anderson, R. A., Feathergill, K. A., de Jonge, C. J., Mack, S. R. y Zaneveld, L. J. (1992) «Facilitative effect of pulsed addition of dibutyryl cAMP on the acrosome reaction of noncapacitated human spermatozoa.», *Journal of andrology*, 13(5), pp. 398-408. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1331009>

Anderson, R. A., Feathergill, K. A., Drisdell, R. C., Rawlins, R. G., Mack, S. R. y Zaneveld, L. J. (1994) «Atrial natriuretic peptide (ANP) as a stimulus of the human acrosome reaction and a component of ovarian follicular fluid: correlation of follicular ANP content with in vitro fertilization outcome.», *Journal of andrology*, 15(1), pp. 61-70. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7910600>.

Andrews, J. C., Nolan, J. P., Hammerstedt, R. H. y Bavister, B. D. (1994) «Role of Zinc during Hamster Sperm Capacitation», *Biology of Reproduction*. Oxford University Press (OUP), 51(6), pp. 1238-1247. doi: 10.1095/biolreprod51.6.1238.

Arcelay, E., Salicioni, A. M., Wertheimer, E. y Visconti, P. E. (2008) «Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation.», *The International journal of developmental biology*, 52(5-6), pp. 463-72. doi: 10.1387/ijdb.072555ea.

## BIBLIOGRAFIA

- Arroyo-Salvo, C., Sanhueza, F., Fuentes, F., Treulén, F., Arias, M. E., Cabrera, P., Silva, M. y Felmer, R. (2019) «Effect of human tubal fluid medium and hyperactivation inducers on stallion sperm capacitation and hyperactivation», *Reproduction in Domestic Animals*, 54(2), pp. 184-194. doi: 10.1111/rda.13328.
- Arroyo, V. y Fernández, J. (2012) «Bases fisiopatológicas del uso de la albúmina humana en la cirrosis hepática», *Gastroenterología y Hepatología. Gastroenterol Hepatol*, 35(1), pp. 42-49. doi: 10.1016/j.gastrohep.2011.06.005.
- Arver, S. y Sjöberg, H. E. E. (1982) «Calcium fractions in seminal plasma and functional properties of human spermatozoa», *Acta Physiologica Scandinavica*, 116(2), pp. 159-165. doi: 10.1111/j.1748-1716.1982.tb07125.x.
- Au, C. E., Hermo, L., Byrne, E., Smirle, J., Fazel, A., Kearney, R. E., Smith, C. E., Vali, H., Fernandez-Rodriguez, J., Simon, P. H. G., Mandato, C., Nilsson, T. y Bergeron, J. J. M. (2015) «Compartmentalization of membrane trafficking, glucose transport, glycolysis, actin, tubulin and the proteasome in the cytoplasmic droplet/Hermes body of epididymal sperm.», *Open biology*, 5(8). doi: 10.1098/rsob.150080.
- Austin, C. R. (1951) «Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg.», *Australian journal of scientific research. Ser. B: Biological sciences*, 4(4), pp. 581-96. doi: <https://doi.org/10.1071/BI9510581>.
- Austin, C. R. (1952) «The capacitation of the mammalian sperm.», *Nature*, 170(4321), p. 326. doi: 10.1038/170326a0.
- Awda, B. J. y Buhr, M. M. (2010) «Extracellular signal-regulated kinases (ERKs) pathway and reactive oxygen species regulate tyrosine phosphorylation in capacitating boar spermatozoa.», *Biology of reproduction*, 83(5), pp. 750-8. doi: 10.1095/biolreprod.109.082008.
- Awda, B. J., Mackenzie-Bell, M. y Buhr, M. M. (2009) «Reactive Oxygen Species and Boar Sperm Function», *Biology of Reproduction*, 81(3), pp. 553-561. doi: 10.1095/biolreprod.109.076471.
- Babaknejad, N., Bahrami, S., Moshtaghi, A. A., Nayeri, H., Rajabi, P. y Iranpour, F. G. (2018) «Cadmium Testicular Toxicity in Male Wistar Rats: Protective Roles of Zinc and Magnesium», *Biological Trace Element Research*, 185(1), pp. 106-115. doi: 10.1007/s12011-017-1218-5.
- Bai, J. y Cederbaum, A. I. (2001) «Mitochondrial Catalase and Oxidative Injury», *Neurosignals*, 10(3-4), pp. 189-199. doi: 10.1159/000046887.
- Baker, M. a, Hetherington, L. y Aitken, R. J. (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, pp. 3182-92. doi: 10.1242/jcs.03055.
- Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Muratori, M. y Forti, G. (2000) «Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction», *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 5(3), pp. E110-23. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11056077>
- Banihani, S. y Khasawneh, F. (2018) «Effect of lansoprazole on human sperm motility, sperm viability, seminal nitric oxide production, and seminal calcium chelation», *Research in Pharmaceutical Sciences*, 13(5), p. 460. doi: 10.4103/1735-5362.236839.

## BIBLIOGRAFIA

- Barak, Y., Goldman, S., Gonen, Y., Nevo, Z., Bartoov, B. y Kogosowski, A. (1998) «Does glucose affect fertilization, development and pregnancy rates of human in-vitro fertilized oocytes?», *Human reproduction* (Oxford, England), 13 Suppl 4, pp. 203-11. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10091070>
- Battistone, M. A., Da Ros, V. G., Salicioni, A. M., Navarrete, F. A., Krapf, D., Visconti, P. E. y Cuasnicú, P. S. (2013) «Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases.», *Molecular human reproduction*, 19(9), pp. 570-80. doi: 10.1093/molehr/gat033.
- Baumber, J., Ball, B. A., Gravance, C. G., Medina, V. y Davies-Morel, M. C. G. (2000) «The Effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm», *Journal of Andrology*, 21(6), pp. 895-902.
- Beckett GJ, A. J. (2005) «Selenium and endocrine systems.», *Journal of Endocrinology*, 184, pp. 455-465. doi: 10.1677/joe.1.05971.
- Bedford, J. M. (1979) «Mechanisms of conception: the maturation and interaction of mammalian gametes.», *Mead Johnson Symposium on Perinatal and Developmental Medicine*, 5(16), pp. 7-17. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/261993>
- Beigi Harchegani, A., Irandoost, A., Mirnamniha, M., Rahmani, H., Tahmasbpour, E. y Shahriary, A. (2019) «Possible mechanisms for the effects of calcium deficiency on male infertility», *International Journal of Fertility and Sterility*, 12(4), pp. 267-272. doi: 10.22074/ijfs.2019.5420.
- Bennet, P., Moatti, J., Mansat, A., Ribbes, H., Cayrac, J., Pontonnier, G., Chap, H. y Douste-Blazy, L. (1987) «Evidence for the activation of phospholipase during acrosome reaction of human sperm elicited by calcium ionophore A23187.», *Biochemical and biophysical Acta*, 919, pp. 255-265.
- Bentov, S., Weil, S., Glazer, L., Sagi, A. y Berman, A. (2010) «Stabilization of amorphous calcium carbonate by phosphate rich organic matrix proteins and by single phosphoamino acids», *Journal of Structural Biology*, 171(2), pp. 207-215. doi: 10.1016/j.jsb.2010.04.007.
- Berridge, M. J., Lipp, P. y Bootman, M. D. (2000) «The versatility and universality of calcium signalling», *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, pp. 11-21. doi: 10.1038/35036035.
- Bittner, J. örg, Hüther, F. y Miska, W. (1999) «Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility», *Fertility and Sterility*, 71(6), pp. 1138-1143. doi: 10.1016/S0015-0282(99)00141-7.
- Bize, I., Santander, G., Cabello, P., Driscoll, D. y Sharpe, C. (1991) «Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro», *Biology of reproduction*, 44(3), pp. 398-403. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2015358>
- Blaser, H., Dostert, C., Mak, T. W. y Brenner, D. (2016) «TNF and ROS Crosstalk in Inflammation», *Trends in Cell Biology*, 26(4), pp. 249-261. doi: 10.1016/j.tcb.2015.12.002.
- Blumenthal, N. C., Betts, F. y Posner, A. S. (1977) «Stabilization of amorphous calcium phosphate by Mg and ATP», *Calcified Tissue Research*. Springer-Verlag, 23(1), pp. 245-250. doi: 10.1007/BF02012793.
- Boerke, A., Tsai, P. S., Garcia-Gil, N., Brewis, I. a y Gadella, B. M. (2008) «Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane:



## BIBLIOGRAFIA

Functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction», *Theriogenology*, 70(8), pp. 1188-1196. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.06.021.

Boiti, C., Castellini, C., Theau-Clément, M., Besenfelder, U., Liguori, L., Renieri, T. y Pizzi, F. (2005) «Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen», *World Rabbit Science*, pp. 71-91. doi: 10.4995/wrs.2005.527.

Bolanca, I., Obhodas, J., Ljiljak, D., Matjacic, L. y Kuna, K. (2016) «Synergetic Effects of K, Ca, Cu and Zn in Human Semen in Relation to Parameters Indicative of Spontaneous Hyperactivation of Spermatozoa», *PloS one*. Editado por A. Guerrero-Hernandez, 11(3), p. e0152445. doi: 10.1371/journal.pone.0152445.

Bosakova, T., Tockstein, A., Sebkova, N., Simonik, O., Adamusova, H., Albrechtova, J., Albrecht, T., Bosakova, Z. y Dvorakova-Hortova, K. (2018) «New Insight into Sperm Capacitation: A Novel Mechanism of 17 $\beta$ -Estradiol Signalling», *International journal of molecular sciences*, 19(12), p. 4011. doi: 10.3390/ijms19124011.

Breed, W. G. (2005) «Evolution of the spermatozoon in muroid rodents.», *Journal of morphology*, 265(3), pp. 271-90. doi: 10.1002/jmor.10357.

Breed, W. G., Leigh, C. M., Aplin, K. P., Shahin, A. A. B. y Avenant, N. L. (2014) «Morphological diversity and evolution of the spermatozoon in the mouse-related clade of rodents.», *Journal of morphology*. doi: 10.1002/jmor.20236.

Breitbart, H., Rotman, T., Rubinstein, S. y Etkovitz, N. (2010) «Role and regulation of PI3K in sperm capacitation and the acrosome reaction», *Molecular and Cellular Endocrinology*, pp. 234-238. doi: 10.1016/j.mce.2009.06.009.

Breitbart, H., Cohen, G. y Rubinstein, S. (2005) «Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction.», *Reproduction (Cambridge, England)*, 129(3), pp. 263-8. doi: 10.1530/rep.1.00269.

Breitbart, H. y Etkovitz, N. (2011) «Role and regulation of EGFR in actin remodeling in sperm capacitation and the acrosome reaction.», *Asian journal of andrology*, 13(1), pp. 106-10. doi: 10.1038/aja.2010.78.

Breitbart, H. y Naor, Z. (1999) «Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction», *Reviews of reproduction*, 4(3), pp. 151-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10521152>.

Breitbart, H., Rubinstein, S. y Etkovitz, N. (2006) «Sperm capacitation is regulated by the crosstalk between protein kinase A and C.», *Molecular and cellular endocrinology*, 252(1-2), pp. 247-9. doi: 10.1016/j.mce.2006.03.019.

Breitbart, H. y Spungin, B. (1997) «The biochemistry of the acrosome reaction.», *Molecular human reproduction*, 3(3), pp. 195-202. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9237245>.

Brewis, I. a, Morton, I. E., Moore, H. D. y England, G. C. (2001) «Solubilized zona pellucida proteins and progesterone induce calcium influx and the acrosome reaction in capacitated dog spermatozoa.», *Molecular reproduction and development*, 60(4), pp. 491-7. doi: 10.1002/mrd.1114.

## BIBLIOGRAFIA

- Brown, G. C. y Borutaite, V. (2012) «There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells», *Mitochondrion*. Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society, 12(1), pp. 1-4. doi: 10.1016/j.mito.2011.02.001.
- Brukman, N. G., Nuñez, S. Y., Puga Molina, L. del C., Buffone, M. G., Darszon, A., Cuasnicu, P. S. y Da Ros, V. G. (2018) «Tyrosine phosphorylation signaling regulates Ca<sup>2+</sup> entry by affecting intracellular pH during human sperm capacitation», *Journal of Cellular Physiology*, 234(4), pp. 5276-5288. doi: 10.1002/jcp.27337.
- Cancel, A. M., Lobdell, D., Mendola, P. y Perreault, S. D. (2000) «Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis.», *Human reproduction (Oxford, England)*, 15(6), pp. 1322-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10831563>
- Cantaert, B., Kuo, D., Matsumura, S., Nishimura, T., Sakamoto, T. y Kato, T. (2017) «Use of Amorphous Calcium Carbonate for the Design of New Materials», *ChemPlusChem*, 82(1), pp. 107-120. doi: 10.1002/cplu.201600457.
- Carrera, A., Moos, J., Ning, X. P., Gerton, G. L., Tesarik, J., Kopf, G. S. y Moss, S. B. (1996) «Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation», *Developmental biology*, 180(1), pp. 284-96. doi: 10.1006/dbio.1996.0301.
- Cassinello, J., Abaigar, T., Gomendio, M. y Roldan, E. R. (1998) «Characteristics of the semen of three endangered species of gazelles (*Gazella dama mhorr*, *G. dorcas neglecta* and *G. cuvieri*).», *Journal of reproduction and fertility*, 113(1), pp. 35-45. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9713374>
- Cecarini, V., Gee, J., Fioretti, E., Amici, M., Angeletti, M., Eleuteri, A. M. y Keller, J. N. (2007) «Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism.», *Biochimica et biophysica acta*, 1773(2), pp. 93-104. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.08.039.
- Chang, H. y Suarez, S. S. (2010) «Rethinking the relationship between hyperactivation and chemotaxis in mammalian sperm», *Biology of reproduction*, 83(4), pp. 507-13. doi: 10.1095/biolreprod.109.083113.
- Chang, H. y Suarez, S. S. (2011) «Two distinct Ca<sup>2+</sup> signaling pathways modulate sperm flagellar beating patterns in mice.», *Biology of reproduction*, 85(2), pp. 296-305. doi: 10.1095/biolreprod.110.089789.
- Chang, M. C. (1951) «Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes», *Nature*, 168(4277), pp. 697-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14882325>
- Chang, M. C. (1984) «The meaning of sperm capacitation. A historical perspective», *Journal of andrology*, 5(2), pp. 45-50. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6370941>
- Chang, M. C. y Pincus, G. (1951) «Physiology of Fertilization in Mammals», *Physiol Rev*, 31(1), pp. 1-26. Disponible en: <http://physrev.physiology.org/content/31/1/1.short>
- Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L. y Lesnfsky, E. J. (2003) «Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III.», *The Journal of biological chemistry*, 278(38), pp. 36027-31. doi: 10.1074/jbc.M304854200.

## BIBLIOGRAFIA

- Chen, W. Y., Ni, Y., Pan, Y. M., Shi, Q. X., Yuan, Y. Y., Chen, A. J., Mao, L. Z., Yu, S. Q. y Roldan, E. R. S. (2005) «GABA, progesterone and zona pellucida activation of PLA<sub>2</sub> and regulation by MEK-ERK1/2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa», *FEBS Letters*, 579(21), pp. 4692-4700. doi: 10.1016/j.febslet.2005.06.090.
- Chi, H. J., Kim, J. H., Ryu, C. S., Lee, J. Y., Park, J. S., Chung, D. Y., Choi, S. Y., Kim, M. H., Chun, E. K. y Roh, S. I. (2008) «Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa.», *Human reproduction (Oxford, England)*, 23(5), pp. 1023-8. doi: 10.1093/humrep/den060.
- Chu, D. S. (2018) «Zinc: A small molecule with a big impact on sperm function», *PLOS Biology*, 16(6), p. e2006204. doi: 10.1371/journal.pbio.2006204.
- Cohen, G., Rubinstein, S., Gur, Y. y Breitbart, H. (2004) «Crosstalk between protein kinase A and C regulates phospholipase D and F-actin formation during sperm capacitation.», *Developmental biology. Academic Press Inc.*, 267(1), pp. 230-41. doi: 10.1016/j.ydbio.2003.10.034.
- Colagar, A. H., Marzony, E. T. y Chaichi, M. J. (2009) «Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men», *Nutrition Research*, 29(2), pp. 82-88. doi: 10.1016/j.nutres.2008.11.007.
- Comporti, M. (1989) «Three models of free radical-induced cell injury.», *Chemico-biological interactions*, 72(1-2), pp. 1-56. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2684438>
- Conine, C. C., Sun, F., Song, L., Rivera-Pérez, J. A. y Rando, O. J. (2018) «Small RNAs Gained during Epididymal Transit of Sperm Are Essential for Embryonic Development in Mice», *Developmental Cell*, 46(4), pp. 470-480.e3. doi: 10.1016/j.devcel.2018.06.024.
- Córdova, A., Strobel, P., Vallejo, A., Valenzuela, P., Ulloa, O., Burgos, R. A., Menarim, B., Rodríguez-Gil, J. E., Ratto, M. y Ramírez-Reveco, A. (2014) «Use of hypometabolic TRIS extenders and high cooling rate refrigeration for cryopreservation of stallion sperm: Presence and sensitivity of 5' AMP-activated protein kinase (AMPK)», *Cryobiology*, 69(3), pp. 473-481. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.10.008.
- Correia, J., Michelangeli, F. y Publicover, S. (2015) «Regulation and roles of Ca<sup>2+</sup> stores in human sperm», *Reproduction*, 150(2), pp. R65-R76. doi: 10.1530/REP-15-0102.
- Cortés-Gutiérrez, E. I., De La Vega, C. G., Bartolomé-Nebreda, J. y Gosálvez, J. (2019) «Characterization of DNA cleavage produced by seminal plasma using leukocytes as a cell target», *Systems Biology in Reproductive Medicine. Taylor and Francis Ltd*, 65(6), pp. 420-429. doi: 10.1080/19396368.2019.1645236.
- Costantini, D., Rowe, M., Butler, M. W. y McGraw, K. J. (2010) «From molecules to living systems: historical and contemporary issues in oxidative stress and antioxidant ecology», *Functional Ecology*, 24(5), pp. 950-959. doi: 10.1111/j.1365-2435.2010.01746.x.
- Costantini, D. (2014) *Oxidative Stress and Hormesis in Evolutionary Ecology and Physiology*, Springer Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-54663-1.
- Costello, S., Michelangeli, F., Nash, K., Lefievre, L., Morris, J., Machado-Oliveira, G., Barratt, C., Kirkman-Brown, J. y Publicover, S. (2009) «Ca<sup>2+</sup>-stores in sperm: Their identities and functions», *Reproduction*, 138(3), pp. 425-437. doi: 10.1530/REP-09-0134.

## BIBLIOGRAFIA

- Cotrim, C. A., Jarrott, R. J., Martin, J. L. y Drew, D. (2019) «A structural overview of the zinc transporters in the cation diffusion facilitator family», *Acta Crystallographica Section D Structural Biology*, 75(4), pp. 357-367. doi: 10.1107/S2059798319003814.
- Cross, A. y Jones, O. (1991) «Enzymic mechanisms of superoxide production.», *Biochimica et biophysica acta*, 1057, pp. 281-298.
- Cross, N. L. (1998) «Role of cholesterol in sperm capacitation content and distribution of sterols in mammalian sperm», *Biology of Reproduction*, 59, pp. 7-11.
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C. y Treviño, C. L. (2011) «Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa.», *Physiological reviews*, 91(4), pp. 1305-55. doi: 10.1152/physrev.00028.2010.
- Davies, K. (1987) «Protein damage and degradation by oxygen radicals I: General aspects», *Journal of Biological Chemistry*, 262, pp. 9895-9901.
- Deavall, D. G., Martin, E. A., Horner, J. M. y Roberts, R. (2012) «Drug-induced oxidative stress and toxicity.», *Journal of toxicology*, 2012, p. 645460. doi: 10.1155/2012/645460.
- delBarco-Trillo, J., García-Álvarez, O., Soler, A. J., Tourmente, M., Garde, J. J. y Roldan, E. R. S. (2016) «A cost for high levels of sperm competition in rodents: increased sperm DNA fragmentation.», *Proceedings in Biological sciences*, 283(1826), p. 20152708. doi: 10.1098/rspb.2015.2708.
- Demarco, I. a., Espinosa, F., Edwards, J., Sosnik, J., De la Vega-Beltrán, J. L., Hockensmith, J. W., Kopf, G. S., Darszon, A. y Visconti, P. E. (2003) «Involvement of a Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter in mouse sperm capacitation», *Journal of Biological Chemistry*, 278(9), pp. 7001-7009. doi: 10.1074/jbc.M206284200.
- Dematteis, A., Miranda, S. D., Novella, M. L., Maldonado, C., Ponce, R. H., Maldera, J. a, Cuasnicu, P. S. y Coronel, C. E. (2008) «Rat caltrin protein modulates the acrosomal exocytosis during sperm capacitation.», *Biology of reproduction*, 79(3), pp. 493-500. doi: 10.1095/biolreprod.107.067538.
- Demott, R. P. y Suarez, S. S. (1992) «Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct.», *Biology of reproduction*, 46(5), pp. 779-85. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1591334>
- Devasagayam, T. P. A., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S. y Lele, R. D. (2004) «Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects», *Journal of Association of Physicians of India*, pp. 794-804. Disponible en: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-19444387198&partnerID=tZOtx3y1>.
- Domínguez-Rebolledo, Á. E., Fernández-Santos, M. R., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Garde, J. J. y Martínez-Pastor, F. (2009) «Washing increases the susceptibility to exogenous oxidative stress in red deer spermatozoa», *Theriogenology*, 72(8), pp. 1073-1084. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.06.027.
- Doshi, S. B., Khullar, K., Sharma, R. K. y Agarwal, A. (2012) «Role of reactive nitrogen species in male infertility», *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(1), p. 109. doi: 10.1186/1477-7827-10-109.

## BIBLIOGRAFIA

- Dressen, C., Schwaller, B., Vegh, G., Leleux, F., Gall, D., Lebrun, P. y Lybaert, P. (2018) «Characterization and potential roles of calretinin in rodent spermatozoa», *Cell Calcium*, 74, pp. 94-101. doi: 10.1016/j.ceca.2018.05.008.
- Druart, X. y de Graaf, S. (2018) «Seminal plasma proteomes and sperm fertility», *Animal Reproduction Science*, 194, pp. 33-40. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.04.061.
- Dunbar, B. S., and O'Rand, M. G. (1991) *A Comparative Overview of Mammalian Fertilization*. Plenum Pre. New York.
- Dupuy, C., Kaniewski, J., Deme, D., Pommieri, J. y Virion, A. (1989) «NADPH-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation catalyzed by thyroid plasma membranes: studies with electron scavengers», *European Journal of Biochemistry*, 185, pp. 597-603.
- Ecroyd, H. W., Jones, R. C. y Aitken, R. J. (2003) «Endogenous redox activity in mouse spermatozoa and its role in regulating the tyrosine phosphorylation events associated with sperm capacitation», *Biology of reproduction*, 69(1), pp. 347-54. doi: 10.1095/biolreprod.102.012716.
- Eddy, E. M. (2007) «The scaffold role of the fibrous sheath», *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 65, pp. 45-62. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17644954>
- Eddy, E. M., Toshimori, K. y O'Brien, D. A. (2003) «Fibrous sheath of mammalian spermatozoa», *Microscopy research and technique*, 61(1), pp. 103-15. doi: 10.1002/jemt.10320.
- Erenpreiss, J., Spano, M., Erenpreisa, J., Bungum, M. y Giwercman, A. (2006) «Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects», *Asian journal of andrology*, 8(1), pp. 11-29. doi: 10.1111/j.1745-7262.2006.00112.x.
- Ernesto, J. I., Muñoz, M. W., Battistone, M. A., Vasen, G., Martínez-López, P., Orta, G., Figueiras-Fierro, D., De la Vega-Beltran, J. L., Moreno, I. A., Guidobaldi, H. A., Giojalas, L., Darszon, A., Cohen, D. J. y Cuasnicú, P. S. (2015) «CRISP1 as a novel CatSper regulator that modulates sperm motility and orientation during fertilization», *Journal of Cell Biology*. Rockefeller University Press, 210(7), pp. 1213-1224. doi: 10.1083/jcb.201412041.
- Esteves, S. C., Zini, A., Coward, R. M., Evenson, D. P., Gosálvez, J., Lewis, S. E. M., Sharma, R. y Humaidan, P. (2020) «Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations», *Andrologia*. Blackwell Publishing Ltd. doi: 10.1111/and.13874.
- Etkovitz, N., Rubinstein, S., Daniel, L. y Breitbart, H. (2007) «Role of PI3-kinase and PI4-kinase in actin polymerization during bovine sperm capacitation.», *Biology of reproduction*, 77(2), pp. 263-73. doi: 10.1095/biolreprod.106.056705.
- Fakih, H., MacLusky, N., DeCherney, A., Wallimann, T. y Huszar, G. (1986) «Enhancement of human sperm motility and velocity in vitro: effects of calcium and creatine phosphate.», *Fertility and sterility*, 46(5), pp. 938-44. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3781011>
- Fallah, A., Mohammad-Hasani, A. y Colagar, A. H. (2018) «Zinc is an essential element for male fertility: A review of zn roles in men's health, germination, sperm quality, and fertilization», *Journal of Reproduction and Infertility*, pp. 69-81. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30009140>
- Fang, L., Ye, Y., Li, E. y Feng, G. (2018) «Magnetic-activated cell sorting (MACS) versus density gradient centrifugation (DGC) for the selection of human sperm in assisted reproductive

## BIBLIOGRAFIA

techniques», *National Medical Journal of China*. Chinese Medical Association, 98(40), pp. 3263-3267. doi: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2018.40.010.

Fawcett, D. W. y Phillips, D. M. (1969) «The fine structure and development of the neck region of the mammalian spermatozoon.», *The Anatomical record*, 165(2), pp. 153-64. doi: 10.1002/ar.1091650204.

Firman, R. C., Bentley, B., Bowman, F., Marchant, F. G.-S., Parthenay, J., Sawyer, J., Stewart, T. y O'Shea, J. E. (2013) «No evidence of sperm conjugate formation in an Australian mouse bearing sperm with three hooks.», *Ecology and evolution*, 3(7), pp. 1856-63. doi: 10.1002/ece3.577.

Firman, R. C. y Simmons, L. W. (2009) «Sperm competition and the evolution of the sperm hook in house mice.», *Journal of evolutionary biology*, 22(12), pp. 2505-11. doi: 10.1111/j.1420-9101.2009.01867.x.

Fléchon, J.-E. (2016) «The acrosome of eutherian mammals», *Cell and Tissue Research*, 363(1), pp. 147-157. doi: 10.1007/s00441-015-2238-0.

Floreani, M., Napoli, E. y Palatini, P. (2002) «Role of antioxidant defences in the species-specific response of isolated atria to menadione», *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology CBP*, 132(2), pp. 143-51. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12106891>

Florman, H. M., Jungnickel, M. K. y Sutton, K. A. (2008) «Regulating the acrosome reaction», *The International journal of developmental biology*, 52(5-6), pp. 503-10. doi: 10.1387/ijdb.082696hf.

Ford, W. C. L. (2004) «Regulation of sperm function by reactive oxygen species», *Human reproduction update*, 10(5), pp. 387-99. doi: 10.1093/humupd/dmh034.

Foresta, C., Garolla, A., Cosci, I., Menegazzo, M., Ferigo, M., Gandin, V. y De Toni, L. (2014) «Role of zinc trafficking in male fertility: from germ to sperm.», *Human reproduction (Oxford, England)*, 29(6), pp. 1134-45. doi: 10.1093/humrep/deu075.

Forsgren, J., Andersson, M., Nilsson, P. y Mihrianyan, A. (2013) «Mesoporous calcium carbonate as a phase stabilizer of amorphous celecoxib--an approach to increase the bioavailability of poorly soluble pharmaceutical substances.», *Advanced Healthcare Materials*, 2(11), pp. 1469-76. doi: 10.1002/adhm.201200391.

Fraser, L. R. (1983) «Potassium ions modulate expression of mouse sperm fertilizing ability, acrosome reaction and hyperactivated motility in vitro», *Journal of reproduction and fertility*, 69(2), pp. 539-53. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6631820>

Fujii, J. y Tsunoda, S. (2011) «Redox regulation of fertilisation and the spermatogenic process», *Asian journal of andrology*, 13(3), pp. 420-3. doi: 10.1038/aja.2011.10.

Fujinoki, M. (2013) «Progesterone-enhanced sperm hyperactivation through IP 3 -PKC and PKA signals», *Reproductive Medicine and Biology*, 12(1), pp. 27-33. doi: 10.1007/s12522-012-0137-6.

Galantino-Homer, H. L., Visconti, P. E. y Kopf, G. S. (1997) «Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-

## BIBLIOGRAFIA

dependent pathway», *Biology of reproduction*, 56(3), pp. 707-19. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9047017>

Gallardo-Montoya, J. M. (2007) «Evaluation of antioxidant system in normal semen», *Revista de Investigacion Clinica*, 59(1), pp. 42-47. Disponible en: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17569299/?from\\_single\\_result=Evaluación+del+sistema+antiox+oidante+en+el+semen+normal](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17569299/?from_single_result=Evaluación+del+sistema+antiox+oidante+en+el+semen+normal)

Garcez, M. E., dos Santos Branco, C., Lara, L. V., Pasqualotto, F. F. y Salvador, M. (2010) «Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen», *Fertility and sterility*, 94(6), pp. 2118-21. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.01.058.

García-Tello, A., Angulo, J. C., Rodriguez-Ubreva, J., Andrés, G., López, J. I., Sánchez-Chapado, M., López-Ruiz, P. y Colás, B. (2014) «Prostate anatomy in motheaten viable (me(v)) mice with mutations in the protein tyrosine phosphatase SHP-1.», *Actas urologicas espanolas*, 38(7), pp. 438-44. doi: 10.1016/j.acuro.2014.02.005.

Garde, J. y Roldan, E. R. (2000) «Stimulation of Ca(2+)-dependent exocytosis of the sperm acrosome by cAMP acting downstream of phospholipase A2.», *Journal of reproduction and fertility*, 118(1), pp. 57-68. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10793626>

Gavella, M. y Lipovac, V. (1992) «NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm infertile men.», *Archives of Andrology*, 28, pp. 135-141.

Gervasi, M. G., Xu, X., Carbajal-Gonzalez, B., Buffone, M. G., Visconti, P. E. y Krapf, D. (2018) «The actin cytoskeleton of the mouse sperm flagellum is organized in a helical structure.», *Journal of cell science*, 131(11), p. jcs215897. doi: 10.1242/jcs.215897.

Gervasi, M. G. y Visconti, P. E. (2017) «Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation.», *Andrology*, 5(2), pp. 204-218. doi: 10.1111/andr.12320.

Ghallab, A. R. M., Abou-Ahmed, M. M., Fad, A. M., El-Badry, D. A., Shahat, A. M. y Moawad, A. R. (2019) «Optimization of the Protocol for Cryopreservation of Arabian Stallion Spermatozoa: Effects of Centrifugation, Semen Extenders and Cryoprotectants.», *Cryo letters*, 40(2), pp. 129-138. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31017613>

Ghasemzadeh, J., Talebi, A. R., Khalili, M. A., Fesahat, F., Halvaei, I., Nabi, A. y Ashourzadeh, S. (2015) «Sperm parameters, protamine deficiency, and apoptosis in total globozoospermia.», *Iranian journal of reproductive medicine*, 13(8), pp. 495-502. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26568752>

Giacone, F., Condorelli, R. A., Mongioì, L. M., Bullara, V., La Vignera, S. y Calogero, A. E. (2016) «In vitro effects of zinc, D-aspartic acid, and coenzyme-Q10 on sperm function.», *Endocrine*. doi: 10.1007/s12020-016-1013-7.

Giojalas, L. C. (1998) «Correlation between response to progesterone and other functional parameters in human spermatozoa», *Fertility and Sterility. Fertil Steril*, 69(1), pp. 107-111. doi: 10.1016/S0015-0282(97)00441-X.

Goldman, R., Ferber, E. y Zort, U. (1992) «Reactive oxygen species are involved in the activation of cellular phospholipase A2», *FEBS Lett*, 309, pp. 190-192.

## BIBLIOGRAFIA

- Gómez Montoto, L., Varea Sánchez, M., Tourmente, M., Martín-Coello, J., Luque-Larena, J. J., Gomendio, M. y Roldan, E. R. S. (2011) «Sperm competition differentially affects swimming velocity and size of spermatozoa from closely related murid rodents: head first.», *Reproduction* (Cambridge, England), 142(6), pp. 819-30. doi: 10.1530/REP-11-0232.
- Goodson, S. G., Zhang, Z., Tsuruta, J. K., Wang, W. y O'Brien, D. a (2011) «Classification of mouse sperm motility patterns using an automated multiclass support vector machines model», *Biology of reproduction*, 84(6), pp. 1207-15. doi: 10.1095/biolreprod.110.088989.
- Gosálvez, J., Gosálbez, A., Arroyo, F., Fernández, J. L. y López-Fernández, C. (2008) «Assessing sperm DNA fragmentation in the field: An adaptation of sperm chromatin dispersion technology», *Biotechnic and Histochemistry. Biotech Histochem*, 83(5), pp. 247-252. doi: 10.1080/10520290802533528.
- Gosalvez, J., Tvrda, E. y Agarwal, A. (2017) «Free radical and superoxide reactivity detection in semen quality assessment: past, present, and future», *Journal of Assisted Reproduction and Genetics. Springer New York LLC*, pp. 697-707. doi: 10.1007/s10815-017-0912-8.
- Griveau, J. F., Dumont, E., Renard, P., Callegari, J. y Lannou, D. (1995) «Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence system in human spermatozoa.», *Journal of reproduction and fertility*, 103, pp. 17-26.
- Griveau, J. F., Renard, P. y Le Lannou, D. (1994) «An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation.», *International journal of andrology*, 17(6), pp. 300-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7744509>
- Griveau, J. F., Renard, P. y Le Lannou, D. (1995) «Superoxide anion production by human spermatozoa as a part of the ionophore-induced acrosome reaction process.», *International journal of andrology*, 18(2), pp. 67-74. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7665212>
- Guerriero, G., Ferro, R., Russo, GL., (2004) «Vitamin E in early stages of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) development.», *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 138(4), pp. 435-439. doi: 10.1016/j.cbpb.2004.06.003.
- Guerriero, G., Trocchia, S., Abdel-Gawad, F. K. y Ciarcia, G. (2014) «Roles of reactive oxygen species in the spermatogenesis regulation», *Frontiers in Endocrinology*, 5(APR), pp. 10-13. doi: 10.3389/fendo.2014.00056.
- Guraya, S. S., and Sidhu, K. S. (1991) «Recent Concepts in the study of capacitation and acrosome reaction in mammalian spermatozoa», en G. S. Toteja, R. S. Sharma, B. K. Singh, S. Mokkapati, and B. N. S. (ed.) *Development of Pre-implantation Embryos. Indian Cou. New Delhi.*, pp. 105-129.
- Guraya, S. S. (1987) *Biology of Spermatogenesis and Spermatozoa in Mammals. Springer-, Springer- Verlag. Springer-. Heidelberg, Berlin.: Springer- Verlag.*
- Guraya, S. S. (2000) «Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in spermatozoa», *International review of cytology*, 199, pp. 1-64. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10874576>
- Hadj Ali, A., Mahdi, M., Ajina, T., Saad, A. y Ali, H. Ben (2018) «Evaluation of Seminal Plasma Antioxidants and Serum Male Hormones Status in Infertile Patients with Unbalanced



## BIBLIOGRAFIA

Chromosomal Abnormalities», *Biology and Medicine*. OMICS International, 10(2), pp. 1-5. doi: 10.4172/0974-8369.1000429.

Hadwan, M. H., Almashhedy, L. A. y Als Salman, A. R. S. (2015) «Oral Zinc Supplementation Restores Superoxide Radical Scavengers to Normal Levels in Spermatozoa of Iraqi Asthenospermic Patients», *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 85(3-4), pp. 165-173. doi: 10.1024/0300-9831/a000235.

Harcourt, A. H. (2006) «Sperm Competition and the Evolution of Nonfertilizing Sperm in Mammals», *Evolution*, 45(2), p. 314. doi: 10.2307/2409666.

Harrison, R. a P., Gadella, B. M. y A.P. Harrison, R. (2005) «Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation», *Theriogenology*, 63(2), pp. 342-51. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.09.016.

Hashemi, M. M., Behnampour, N., Nejabat, M., Tabandeh, A., Ghazi-Moghaddam, B. y Joshaghani, H. R. (2018) «Impact of Seminal Plasma Trace Elements on Human Sperm Motility Parameters», *Romanian Journal of Internal Medicine*, 56(1), pp. 15-20. doi: 10.1515/rjim-2017-0034.

Hernández-Silva, G. y Chirinos, M. (2019) «Proteins from male and female reproductive tracts involved in sperm function regulation», *Zygote*, 27(1), pp. 5-16. doi: 10.1017/S096719941800062X.

Herrero, M. B., Chatterjee, S., Lefièvre, L., de Lamirande, E. y Gagnon, C. (2000) «Nitric oxide interacts with the cAMP pathway to modulate capacitation of human spermatozoa.», *Free Radical Biology and Medicine*, 29(6), pp. 522-536. doi: 10.1016/S0891-5849(00)00339-7.

Herrero, M. B. y Gagnon, C. (2001) «Nitric Oxide: A Novel Mediator of Sperm Function», *Journal of andrology*. Blackwell Publishing Ltd, 22(3), pp. 349-56. doi: 10.1002/j.1939-4640.2001.tb02188.x.

Herrero, M. B., de Lamirande, E. y Gagnon, C. (2003) «Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa», *Current pharmaceutical design*, 9(5), pp. 419-25. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12570819>

Herrick, J. R., Strauss, K. J., Schneiderman, A., Rawlins, M., Stevens, J., Schoolcraft, W. B. y Krisher, R. L. (2015) «The beneficial effects of reduced magnesium during the oocyte-to-embryo transition are conserved in mice, domestic cats and humans», *Reproduction, Fertility and Development*, 27(2), p. 323. doi: 10.1071/RD13268.

Hinshaw, D., Sklar, L., Schraufstatter, I., Hyslop, P., Rossi, M., Spragg, R. y Cochrane, C. (1986) «Cytoskeletal and morphologic impact of cellular oxidant injury.», *American journal Pathology*, 123, pp. 454-464.

Ho, H. C. y Suarez, S. S. (2001a) «An inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-gated intracellular Ca<sup>2+</sup> store is involved in regulating sperm hyperactivated motility», *Biology of Reproduction*, 65(5), pp. 1606-1615. doi: 10.1095/biolreprod65.5.1606.

Ho, H. C. y Suarez, S. S. (2001b) «Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation.», *Reproduction (Cambridge, England)*, 122(4), pp. 519-526. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11570958>

## BIBLIOGRAFIA

- Ho, H. C. y Suarez, S. S. (2003) «Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility», *Biology of Reproduction*, 68(5), pp. 1590-1596. doi: 10.1095/biolreprod.102.011320.
- Holland, M. K., Alvarez, J. G. y Storey, B. T. (1982) «Production of superoxide and activity of superoxide dismutase in rabbit epididymal spermatozoa.», *Biology of Reproduction*, 27, pp. 1109-1118.
- Holland, M. K., Alvarez, J. G. y Storey, B. T. (2005) «Production of Superoxide and Activity of Superoxide Dismutase in Rabbit Epididymal Spermatozoa», *Biology of Reproduction*, 27(5), pp. 1109-1118. doi: 10.1095/biolreprod27.5.1109.
- Holland, M. K. y Storey, B. T. (1981) «Oxygen metabolism of mammalian spermatozoa. Generation of hydrogen peroxide by rabbit epididymal spermatozoa.», *Biochemistry Journal*, 198, pp. 273-280.
- Hollis, B. W. (2018) Calcium In Human Health, *The American Journal of Clinical Nutrition*. doi: 10.1093/ajcn/83.6.1444.
- Hoogewijs, M., Rijsselaere, T., De Vlieghe, S., Vanhaesebrouck, E., De Schauwer, C., Govaere, J., Thys, M., Hoflack, G., Van Soom, A. y de Kruif, A. (2010) «Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation.», *Theriogenology*, 74(1), pp. 118-126. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.01.022.
- Huang, I., Jones, J. y Khorram, O. (2006) «Human seminal plasma nitric oxide: correlation with sperm morphology and testosterone.», *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 12(3), pp. CR103-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16501419>
- Huang, Z., Danshina, P. V, Mohr, K., Qu, W., Goodson, S. G., O'Connell, T. M. y O'Brien, D. A. (2017) «Sperm function, protein phosphorylation, and metabolism differ in mice lacking successive sperm-specific glycolytic enzymes†», *Biology of Reproduction*, 97(4), pp. 586-597. doi: 10.1093/biolre/iox103.
- Hunter, R. H. F. y Rodriguez-Martinez, H. (2004) «Capacitation of mammalian spermatozoa in vivo, with a specific focus on events in the Fallopian tubes.», *Molecular reproduction and development*, 67(2), pp. 243-50. doi: 10.1002/mrd.10390.
- Hurtado de Llera, A., Martin-Hidalgo, D., Gil, M. C., Garcia-Marin, L. J. y Bragado, M. J. (2016) «New insights into transduction pathways that regulate boar sperm function», *Theriogenology*, 85(1), pp. 12-20. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.05.008.
- Immler, S., Moore, H. D. M., Breed, W. G. y Birkhead, T. R. (2007) «By hook or by crook? Morphometry, competition and cooperation in rodent sperm.», *PloS one*, 2(1), p. e170. doi: 10.1371/journal.pone.0000170.
- De Iuliis, G. N., Thomson, L. K., Mitchell, L. A., Finnie, J. M., Koppers, A. J., A, H., Nixon, B. y Aitken, R. J. (2009) «DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'- deoxyguanosine, a marker of oxidative stress.», *Biology of Reproduction*, 81, pp. 517-524.
- IUPAC (1997) *Compendium of Chemical Terminology - Solubility*. Oxford: BI, Orange book. Oxford: BI. Editado por O. B. Science. Oxford.

## BIBLIOGRAFIA

- Iwasaki, A. y Gagnon, C. (1992) «Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients», *Fertility and sterility*, 57(2), pp. 409-16. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1735495>
- Jaiswal, B. S. y Conti, M. (2003) «Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 100(19), pp. 10676-10681. doi: 10.1073/pnas.1831008100.
- Jeulin, C., Soufir, J., Weber, P., Laval-Martin, D. y Calvayrac, R. (1989) «Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma», *Gamete Res*, 24, pp. 185-196.
- Jimenez-Gonzalez, C., Michelangeli, F., Harper, C. V, Barratt, C. L. R. y Publicover, S. J. (2006) «Calcium signalling in human spermatozoa: A specialized “toolkit” of channels, transporters and stores», *Human Reproduction Update*, pp. 253-267. doi: 10.1093/humupd/dmi050.
- Jin, S.-K. y Yang, W.-X. (2017) «Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated?», *Oncotarget*, 8(2), pp. 3600-3627. doi: 10.18632/oncotarget.12274.
- Jones, R., Mann, T. y Sherins, R. (1979) «Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma», *Fertility and sterility*, 31, pp. 531-537.
- June, C. H., Abe, R. y Rabinovitch, P. S. (2001) «Measurement of intracellular calcium ions by flow cytometry», *Current Protocols in Cytometry*, Chapter 9, p. Unit 9.8. doi: 10.1002/0471142956.cy0908s02.
- Kalab, P., Visconti, P., Leclerc, P. y Kopf, G. S. (1994) «p95, the major phosphotyrosine-containing protein in mouse spermatozoa, is a hexokinase with unique properties», *The Journal of biological chemistry*, 269(5), pp. 3810-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7508920>
- Kanippayoor, R. L., Alpern, J. H. M. y Moehring, A. J. (2013) «Protamines and spermatogenesis in *Drosophila* and *Homo sapiens* : A comparative analysis.», *Spermatogenesis*, 3(2), p. e24376. doi: 10.4161/spmg.24376.
- Kasperczyk, A., Dobrakowski, M., Czuba, Z., Kapka-Skrzypczak, L. y Kasperczyk, S. (2015) «Environmental exposure to zinc and copper influences sperm quality in fertile males», *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 23(1), pp. 138-143. doi: 10.5604/12321966.1196869.
- Kasperczyk, A., Dobrakowski, M., Zalejska-Fiolka, J., Horak, S. y Birkner, E. (2015) «Magnesium and selected parameters of the non-enzymatic antioxidant and immune systems and oxidative stress intensity in the seminal plasma of fertile males», *Magnesium research*, 28(1), pp. 14-22. doi: 10.1684/mrh.2015.0377.
- Kato, T., Sugawara, A. y Hosoda, N. (2002) «Calcium Carbonate–Organic Hybrid Materials», *Advanced Materials*. WILEY-VCH Verlag GmbH, 14(12), p. 869. doi: 10.1002/1521-4095(20020618)14:12<869::AID-ADMA869>3.0.CO;2-E.
- Kay, V. J. y Robertson, L. (1998) «Hyperactivated motility of human spermatozoa: a review of physiological function and application in assisted reproduction.», *Human reproduction update*, 4(6), pp. 776-86. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10098469>.

## BIBLIOGRAFIA

- Kerns, K., Zigo, M., Drobnis, E. Z., Sutovsky, M. y Sutovsky, P. (2018) «Zinc ion flux during mammalian sperm capacitation», *Nature Communications*, 9(1), p. 2061. doi: 10.1038/s41467-018-04523-y.
- Kerns, K., Zigo, M. y Sutovsky, P. (2018) «Zinc: A necessary ion for mammalian sperm fertilization competency», *International Journal of Molecular Sciences*, p. 4097. doi: 10.3390/ijms19124097.
- Kim, K. S. y Gerton, G. L. (2003) «Differential release of soluble and matrix components: Evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm», *Developmental Biology*, 264(1), pp. 141-152. doi: 10.1016/j.ydbio.2003.08.006.
- Kim, S.-H., Yu, D.-H. y Kim, Y.-J. (2010) «Apoptosis-like change, ROS, and DNA status in cryopreserved canine sperm recovered by glass wool filtration and Percoll gradient centrifugation techniques.», *Animal reproduction science*, 119(1-2), pp. 106-14. doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.11.002.
- Knobil, E., Neill, J., Greenwald, G., Markert, C., Pfaff, D., R. Yanagimachi, E.M. Eddy, D. A. O., Knobil, E., Neill, J., Greenwald, G., Markert, C. y Pfaff, D. (1994) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, Raven Press New York. Raven Press. Editado por E. Knobil y J. D. Neill. Ney York.
- Kopf, G. S. (1989) «Mechanisms of signal transduction in mouse spermatozoa», *Annals of the New York Academy of Sciences*, 564, pp. 289-302. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2549836>
- Kopf, G. S. (1990) «The zona pellucida-induced acrosome reaction: A model for sperm signal transduction.», en B. D. Bavister, J. Cummins, E. R. S. R. (ed.) *Fertilization in Mammal*. Serono Sym. Norwell, Massachusetts.: Serono Symposia, pp. 253–266.
- Koppers, A. J., De Iuliis, G. N., Finnie, J. M., McLaughlin, E. a y Aitken, R. J. (2008) «Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa.», *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 93(8), pp. 3199-207. doi: 10.1210/jc.2007-2616.
- Koppers, A. J., Manohar, L. G. y Aitken, R. J. (2010) «Stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa.», *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc., 48(1), pp. 112-119. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.10.033.
- Koshio, O., Akanuma, Y. y Kasuga, M. (1988) «Hydrogen peroxide stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor and its tyrosine kinase activity in intact cells.», *Biochemistry Journal*, 250, pp. 95-101.
- Krapf, D., Arcelay, E., Wertheimer, E. V., Sanjay, A., Pilder, S. H., Salicioni, A. M. y Visconti, P. E. (2010) «Inhibition of Ser/Thr Phosphatases Induces Capacitation-associated Signaling in the Presence of Src Kinase Inhibitors», *Journal of Biological Chemistry*, 285(11), pp. 7977-7985. doi: 10.1074/jbc.M109.085845.
- Kumaresan, a, Siqueira, a P., Hossain, M. S., Johannisson, a, Eriksson, I., Wallgren, M. y Bergqvist, a S. (2012) «Quantification of kinetic changes in protein tyrosine phosphorylation and cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration in boar spermatozoa during cryopreservation.», *Reproduction, fertility, and development*, 24(4), pp. 531-42. doi: 10.1071/RD11074.

## BIBLIOGRAFIA

Kwon, W.-S., Rahman, M. S., Lee, J.-S., Kim, J., Yoon, S.-J., Park, Y.-J., You, Y.-A., Hwang, S. y Pang, M.-G. (2014) «A comprehensive proteomic approach to identifying capacitation related proteins in boar spermatozoa.», *BMC genomics*, 15, p. 897. doi: 10.1186/1471-2164-15-897.

De La Vega-Beltran, J. L., Sánchez-Cárdenas, C., Krapf, D., Hernandez-González, E. O., Wertheimer, E., Treviño, C. L., Visconti, P. E. y Darszon, A. (2012) «Mouse Sperm Membrane Potential Hyperpolarization Is Necessary and Sufficient to Prepare Sperm for the Acrosome Reaction», *Journal of Biological Chemistry*, 287(53), pp. 44384-44393. doi: 10.1074/jbc.M112.393488.

de Lamirande, E., Iwasaki, A., Gagnon, C. y Kovalski, N. (1991) «Reactive oxygen species and human spermatozoa», *Annals of the New York Academy of Sciences*, 637, pp. 436-444.

de Lamirande, E. y Gagnon, C. (1992) «Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility», *Journal of Andrology*, 13(5), pp. 379-386. doi: 10.1002/j.1939-4640.1992.tb03328.x.

de Lamirande, E. y Gagnon, C. (1993a) «A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa», *International journal of andrology*, 16(1), pp. 21-5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8385650>.

de Lamirande, E. y Gagnon, C. (1993b) «Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process», *Free radical biology & medicine*, 14(2), pp. 157-66. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8381103>

de Lamirande, E. y Gagnon, C. (1993c) «Human sperm hyperactivation in whole semen and its association with low superoxide scavenging capacity in seminal plasma.», *Fertility and sterility*, 59((6)), pp. 1291-1295.

de Lamirande, E. y Gagnon, C. (1995) «Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa.», *Free radical biology & medicine*, 18(3), pp. 487-95. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9101239>.

de Lamirande, E. y Gagnon, C. (2002) «The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway is involved in human sperm function and modulated by the superoxide anion», *Molecular Human Reproduction*, 8(2), pp. 124-135. doi: 10.1093/molehr/8.2.124.

de Lamirande, E. y Lamothe, G. (2010) «Levels of semenogelin in human spermatozoa decrease during capacitation: involvement of reactive oxygen species and zinc.», *Human reproduction (Oxford, England)*, 25(7), pp. 1619-30. doi: 10.1093/humrep/deq110.

de Lamirande, E., Lamothe, G. y Villemure, M. (2009) «Control of superoxide and nitric oxide formation during human sperm capacitation», *Free radical biology & medicine*, 46(10), pp. 1420-7. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.022.

de Lamirande, E., Leclerc, P. y Gagnon, C. (1997) «Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization», *Molecular human reproduction*, 3(3), pp. 175-94. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9237244>

de Lamirande, E. y O'Flaherty, C. (2008) «Sperm activation: Role of reactive oxygen species and kinases», *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1784(1), pp. 106-115. doi: 10.1016/j.bbapap.2007.08.024.

## BIBLIOGRAFIA

Leclerc, P. y Kopf, G. S. (1995) «Mouse sperm adenylyl cyclase: general properties and regulation by the zona pellucida», *Biology of reproduction*, 52(6), pp. 1227-33. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7632830>

Leclerc, P., de Lamirande, E. y Gagnon, C. (1996) «Cyclic adenosine 3',5'monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility», *Biology of reproduction*, 55(3), pp. 684-92. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8862788>

Leclerc, P., de Lamirande, E. y Gagnon, C. (1997) «Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives», *Free radical biology & medicine*, 22(4), pp. 643-656. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9013127>

Lee, M. A. y Storey, B. T. (1985) «Evidence for plasma membrane impermeability to small ions in acrosome-intact mouse spermatozoa bound to mouse zonae pellucidae, using an aminoacridine fluorescent pH probe: time course of the zona-induced acrosome reaction monitored by both chlortetracycl», *Biology of reproduction*, 33(1), pp. 235-46. doi: 10.1095/biolreprod33.1.235.

Leemans, B., Stout, T. A. E., De Schauwer, C., Heras, S., Nelis, H., Hoogewijs, M., Van Soom, A. y Gadella, B. M. (2019) «Update on mammalian sperm capacitation: how much does the horse differ from other species?», *Reproduction*, 157(5), pp. R181-R197. doi: 10.1530/REP-18-0541.

Lewis, B. y Aitken, R. J. (2001) «A redox-regulated tyrosine phosphorylation cascade in rat spermatozoa», *Journal of Andrology. J Androl*, 22(4), pp. 611-622. doi: 10.1002/j.1939-4640.2001.tb02221.x.

Lewis, S. E., Boyle, P., McKinney, K., Young, I. y Thomson, W. (1994) «Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men», *Fertility and sterility*, 64, pp. 868-870.

Lewis, S. E. y Aitken, R. J. (2005) «DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy», *Cell Tissue Res*, 322, pp. 33-41.

Li, K., Jin, J. Y., Chen, W. Y., Shi, Q. X., Ni, Y. y Roldan, E. R. S. (2012) «Secretory phospholipase A2 group IID is involved in progesterone-induced acrosomal exocytosis of human spermatozoa», *Journal of Andrology*, 33(5), pp. 975-983. doi: 10.2164/jandrol.111.014886.

Liang, H., Miao, M., Chen, J., Chen, K., Wu, B., Dai, Q., Wang, J., Sun, F., Shi, H. y Yuan, W. (2016) «The Association Between Calcium, Magnesium, and Ratio of Calcium/Magnesium in Seminal Plasma and Sperm Quality», *Biological Trace Element Research. Springer US*, 174(1), pp. 1-7. doi: 10.1007/s12011-016-0682-7.

Lim, S., Kierzek, M., O'Connor, A. E., Brenker, C., Merriner, D. J., Okuda, H., Volpert, M., Gaikwad, A., Bianco, D., Potter, D., Prabhakar, R., Strünker, T. y O'Bryan, M. K. (2019) «CRISP2 Is a Regulator of Multiple Aspects of Sperm Function and Male Fertility», *Endocrinology*, 160(4), pp. 915-924. doi: 10.1210/en.2018-01076.

Lindholmer, C. y Eliasson, R. (1974) «The effects of albumin, magnesium, and zinc on human sperm survival in different fractions of split ejaculates», *Fertility and sterility*, 25(5), pp. 424-31.

Lishko, P. V., Kirichok, Y., Ren, D., Navarro, B., Chung, J.-J. y Clapham, D. E. (2012) «The Control of Male Fertility by Spermatozoan Ion Channels», *Annual Review of Physiology*, 74(1), pp. 453-475. doi: 10.1146/annurev-physiol-020911-153258.

## BIBLIOGRAFIA

- Lishko, P. V., Botchkina, I. L. y Kirichok, Y. (2011) «Progesterone activates the principal Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm», *Nature*, 471(7338), pp. 387-392. doi: 10.1038/nature09767.
- Lobo, V. y Parte, P. (2019) «Membrane-bound Glucose regulated protein 78 interacts with alpha-2-macroglobulin to promote actin reorganization in sperm during epididymal maturation», *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 25(3), pp. 137-155. doi: 10.1093/molehr/gay055.
- López-Rodríguez, G. y Suárez-Diequez, T. (2010) «Albumin and transferrin are antioxidants that prevent lipoperoxidation in vitro», *Revista latinoamericana de química*, 38(3), pp. 10-15. Doi:59432010000300004
- Lu, J., Wang, Z., Cao, J., Chen, Y. y Dong, Y. (2018) «A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction», *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 16(1), p. 80. doi: 10.1186/s12958-018-0391-5.
- Lüke, L., Vicens, A., Tourmente, M. y Roldan, E. R. S. (2014) «Evolution of protamine genes and changes in sperm head phenotype in rodents», *Biology of reproduction*, 90(3), p. 67. doi: 10.1095/biolreprod.113.115956.
- Lüke, L., Tourmente, M., Dopazo, H., Serra, F. y Roldan, E. R. S. (2016) «Selective constraints on protamine 2 in primates and rodents», *BMC Evolutionary Biology*, 16(1), p. 21. doi: 10.1186/s12862-016-0588-1.
- Lüke, L., Tourmente, M. y Roldan, E. R. S. (2016) «Sexual Selection of Protamine 1 in Mammals», *Molecular Biology and Evolution*, 33(1), pp. 174-184. doi: 10.1093/molbev/msv209.
- Luque, G. M., Dalotto-Moreno, T., Martín-Hidalgo, D., Ritagliati, C., Puga Molina, L. C., Romarowski, A., Balestrini, P. A., Schiavi-Ehrenhaus, L. J., Gilio, N., Krapf, D., Visconti, P. E. y Buffone, M. G. (2018) «Only a subpopulation of mouse sperm displays a rapid increase in intracellular calcium during capacitation», *Journal of Cellular Physiology*, 233(12), pp. 9685-9700. doi: 10.1002/jcp.26883.
- Mahadevan, M. M., Miller, M. M. y Moutos, D. M. (1997) «Absence of glucose decreases human fertilization and sperm movement characteristics in vitro», *Human reproduction (Oxford, England)*, 12(1), pp. 119-23. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9043915>
- Majzoub, A. y Agarwal, A. (2018) «Systematic review of antioxidant types and doses in male infertility: Benefits on semen parameters, advanced sperm function, assisted reproduction and live-birth rate», *Arab journal of urology*, 16(1), pp. 113-124. doi: 10.1016/j.aju.2017.11.013.
- Malo, C., Crichton, E. G., Morrell, J. M., Pukazhenthil, B. S. y Skidmore, J. A. (2017) «Single layer centrifugation of fresh dromedary camel semen improves sperm quality and in vitro fertilization capacity compared with simple sperm washing», *Reproduction in Domestic Animals*, 52(6), pp. 1097-1103. doi: 10.1111/rda.13036.
- Maneesh, M. y Jayalekshmi, H. (2006) «Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction», *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 21(2), pp. 80-89.
- Márquez, B., Igotz, G. y Suarez, S. S. (2007) «Contributions of extracellular and intracellular Ca<sup>2+</sup> to regulation of sperm motility: Release of intracellular stores can hyperactivate CatSper1 and CatSper2 null sperm», *Developmental Biology*, 303(1), pp. 214-221. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.11.007.

## BIBLIOGRAFIA

- Márquez, B. y Suarez, S. S. (2004) «Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation», *Biology of reproduction*, 70(6), pp. 1626-33. doi: 10.1095/biolreprod.103.026476.
- Márquez, B. y Suarez, S. S. (2007) «Bovine sperm hyperactivation is promoted by alkaline-stimulated Ca<sup>2+</sup> influx», *Biology of Reproduction*, 76(4), pp. 660-665. doi: 10.1095/biolreprod.106.055038.
- Martin, G., Sabido, O., Durand, P. y Levy, R. (2005) «Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction.», *Human reproduction (Oxford, England)*, 20(12), pp. 3459-68. doi: 10.1093/humrep/dei245.
- Mbizvo, M. T., Burkman, L. J. y Alexander, N. J. (1990) «Human follicular fluid stimulates hyperactivated motility in human sperm», *Fertility and sterility*, 54(4), pp. 708-12. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2209894>
- Meier, B., Cross, A., Hancock, J., Kaup, F. y Jones, O. (1991) «Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblast», *Biochemistry Journal*, 275, pp. 241-245.
- Meiron, O. E., Bar-David, E., Aflalo, E. D., Shechter, A., Stepensky, D., Berman, A. y Sagi, A. (2011) «Solubility and bioavailability of stabilized amorphous calcium carbonate», *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(2), pp. 364-372. doi: 10.1002/jbmr.196.
- Ménézo, Y., Pluntz, L., Chouteau, J., Gurgan, T., Demirol, A., Dalleac, A. y Benkhalifa, M. (2011) «Zinc concentrations in serum and follicular fluid during ovarian stimulation and expression of Zn<sup>2+</sup> transporters in human oocytes and cumulus cells», *Reproductive BioMedicine Online. Reprod Biomed Online*, 22(6), pp. 647-652. doi: 10.1016/j.rbmo.2011.03.015.
- Michailov, Y., Ickowicz, D. y Breitbart, H. (2014) «Zn<sup>2+</sup>-stimulation of sperm capacitation and of the acrosome reaction is mediated by EGFR activation», *Developmental Biology*, 396(2), pp. 246-255. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.10.009.
- Mitchell, L. a, Nixon, B. y Aitken, R. J. (2007) «Analysis of chaperone proteins associated with human spermatozoa during capacitation», *Molecular Human Reproduction*, 13(9), pp. 605-613. doi: 10.1093/molehr/gam043.
- Moghbeli, M., Kohram, H., Zare-Shahaneh, A., Zhandi, M., Sharideh, H. y Sharafi, M. (2016) «Effect of sperm concentration on characteristics and fertilization capacity of rooster sperm frozen in the presence of the antioxidants catalase and vitamin E», *Theriogenology*, 86(6), pp. 1393-1398. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.03.038.
- Mohammadzadeh, M., Ramazani, V., Khalili, M. A., Hamishekar, H., Dehghan Marvast, L., Talebi, A. R., Zare-Zardini, H. y Ghasemi, S. (2019) «Medium containing different concentrations of catalase as a strategy for optimising sperm parameters and chromatin in normospermic persons», *Andrologia*, 51(4), p. e13231. doi: 10.1111/and.13231.
- Moore, H., Dvorakova-Hortova, K., Jenkis, N. y Breed, W. (2002) «Exceptional sperm cooperation in the wood mouse», *Nature*, 418, pp. 174-177.
- Morte, M. I., Rodrigues, A. M. S., Soares, D., Rodrigues, A. M. S., Gamboa, S. y Ramalho-Santos, J. (2008) «The quantification of lipid and protein oxidation in stallion spermatozoa and seminal plasma: seasonal distinctions and correlations with DNA strand breaks, classical seminal



## BIBLIOGRAFIA

parameters and stallion fertility.», *Animal reproduction science*, 106(1-2), pp. 36-47. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.03.020.

Mortimer, D. y Mortimer, S. T. (2013) «Computer-Aided Sperm Analysis (CASA) of Sperm Motility and Hyperactivation», en *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), pp. 77-87. doi: 10.1007/978-1-62703-038-0\_8.

Mortimer, S. T., Schéväert, D., Swan, M. a y Mortimer, D. (1997) «Quantitative observations of flagellar motility of capacitating human spermatozoa», *Human reproduction* (Oxford, England), 12(5), pp. 1006-12. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9194655>.

Mortimer, S. T. (2000) «CASA--practical aspects», *Journal of andrology*, 21(4), pp. 515-24. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10901437>

Mortimer, S. T. y Mortimer, D. (1990) «Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions», *Journal of andrology*, 11(3), pp. 195-203. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2384341>

Mortimer, S. T., Swan, M. A. y Mortimer, D. (1996) «Fractal analysis of capacitating human spermatozoa», *Human Reproduction*, 11(5), pp. 1049-1054. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a019295.

Moubasher, A. E., El Din, A. M. E., Ali, M. E., El-sherif, W. T. y Gaber, H. D. (2013) «Catalase improves motility, vitality and DNA integrity of cryopreserved human spermatozoa», *Andrologia*, 45(2), pp. 135-139. doi: 10.1111/j.1439-0272.2012.01310.x.

Murakami, S. y Motohashi, H. (2015) «Roles of Nrf2 in cell proliferation and differentiation», *Free Radical Biology and Medicine*, 88(Pt B), pp. 168-178. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.030.

Murase, T. y Roldan, E. R. S. (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(3), pp. 1017-1023. doi: 10.1042/bj3201017.

Muratori, M., Tarozzi, N., Carpentiero, F., Danti, S., Perrone, F. M., Cambi, M., Casini, A., Azzari, C., Boni, L., Maggi, M., Borini, A. y Baldi, E. (2019) «Sperm selection with density gradient centrifugation and swim up: effect on DNA fragmentation in viable spermatozoa», *Scientific Reports*, 9(1), p. 7492. doi: 10.1038/s41598-019-43981-2.

Murphy, M. P. P. P. (2009) «How mitochondria produce reactive oxygen species», *Biochemical Journal*, 417(1), pp. 1-13. doi: 10.1042/BJ20081386.

Myles, D. G. y Primakoff, P. (1997) «Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg», *Biology of reproduction*, 56(2), pp. 320-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9116127>

Narasimhaiah, M., Arunachalam, A., Sellappan, S., Mayasula, V., Guvvala, P., Ghosh, S., Chandra, V., Ghosh, J. y Kumar, H. (2018) «Organic zinc and copper supplementation on antioxidant protective mechanism and their correlation with sperm functional characteristics in goats», *Reproduction in Domestic Animals*, 53(3), pp. 644-654. doi: 10.1111/rda.13154.

## BIBLIOGRAFIA

- Naresh, S. y Atreja, S. K. (2015) «The protein tyrosine phosphorylation during in vitro capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa», *Cryobiology*, 70(3), pp. 211-216. doi: 10.1016/j.cryobiol.2015.03.008.
- Nassar, A. (1999) «Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility», *Fertility and Sterility*, 71(5), pp. 919-923. doi: 10.1016/S0015-0282(99)00013-8.
- Navarrete, F. A., García-Vázquez, F. A., Alvau, A., Escoffier, J., Krapf, D., Sánchez-Cárdenas, C., Salicioni, A. M., Darszon, A. y Visconti, P. E. (2015) «Biphasic role of calcium in mouse sperm capacitation signaling pathways.», *Journal of cellular physiology*, 230(8), pp. 1758-1769. doi: 10.1002/jcp.24873.
- Navarro, B., Kirichok, Y., Chung, J.-J. y Clapham, D. E. (2008) «Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa», *The International journal of developmental biology*, 52(5-6), pp. 607-13. doi: 10.1387/ijdb.072554bn.
- Naz, R. K. (1996) «Involvement of protein tyrosine phosphorylation of human sperm in capacitation/acrosome reaction and zona pellucida binding», *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 1, pp. d206-13. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9159228>
- Naz, R. K. y Rajesh, P. B. (2004) «Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction», *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 2(75), p. 75. doi: 10.1186/1477-7827-2-75.
- Nebel, H., Neumann, M., Mayer, C. y Epple, M. (2008) «On the Structure of Amorphous Calcium Carbonate: A Detailed Study by Solid-State NMR Spectroscopy», *Inorganic Chemistry*, 47(17), pp. 7874-7879. doi: 10.1021/ic8007409.
- Neill, J. M. y Olds-Clarke, P. (1987) «A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required», *Gamete Research*, 18(2), pp. 121-140. doi: 10.1002/mrd.1120180204.
- Nguyen, T. M. D., Alves, S., Grasseau, I., Métayer-Coustard, S., Praud, C., Froment, P. y Blesbois, E. (2014) «Central Role of 5'-AMP-Activated Protein Kinase in Chicken Sperm Functions», *Biology of Reproduction*, 91(5), p. 121. doi: 10.1095/biolreprod.114.121855.
- Nishimura, H. y L'Hernault, S. W. (2017) «Spermatogenesis», *Current Biology*, pp. R988-R994. doi: 10.1016/j.cub.2017.07.067.
- Nixon, B., MacIntyre, D. a, Mitchell, L. a, Gibbs, G. M., O'Bryan, M. y Aitken, R. J. (2006) «The Identification of Mouse Sperm-Surface-Associated Proteins and Characterization of Their Ability to Act as Decapacitation Factors», *Biology of Reproduction*, 74(2), pp. 275-287. doi: 10.1095/biolreprod.105.044644.
- O'Flaherty, C, Breininger, E., Beorlegui, N. y Beconi, M. T. (2005) «Acrosome reaction in bovine spermatozoa: role of reactive oxygen species and lactate dehydrogenase C4», *Biochimica et biophysica acta*, 1726(1), pp. 96-101. doi: 10.1016/j.bbagen.2005.07.012.
- O'Flaherty, C. (2014a) «Peroxiredoxins: hidden players in the antioxidant defence of human spermatozoa», *Basic and clinical andrology*, 24, p. 4. doi: 10.1186/2051-4190-24-4.
- O'Flaherty, C. (2014b) «The Enzymatic Antioxidant System of Human Spermatozoa», *Advances in Andrology*. Hindawi, 2014, pp. 1-15. doi: 10.1155/2014/626374.

## BIBLIOGRAFIA

O'Flaherty, C. (2015) «Redox regulation of mammalian sperm capacitation », *Asian journal of andrology*, 17(4), pp. 583-90. doi: 10.4103/1008-682X.153303.

O'Flaherty, Cristián, de Lamirande, E. y Gagnon, C. (2005) «Reactive Oxygen Species and Protein Kinases Modulate the Level of Phospho-MEK-Like Proteins During Human Sperm Capacitation1», *Biology of Reproduction*, 73(1), pp. 94-105. doi: 10.1095/biolreprod.104.038794.

O'Flaherty, C., de Lamirande, E. y Gagnon, C. (2006a) «Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events», *Free radical biology & medicine*, 41(4), pp. 528-40. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.027.

O'Flaherty, C., de Lamirande, E. y Gagnon, C. (2006b) «Reactive oxygen species modulate independent protein phosphorylation pathways during human sperm capacitation», *Free radical biology & medicine*, 40(6), pp. 1045-1055. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.055.

O'Toole, C. M. B., Roldan, E. R. S., Hampton, P. y Fraser, L. R. (1996) «A role for diacylglycerol in human sperm acrosomal exocytosis», *Molecular Human Reproduction*, 2(5), pp. 317-326. doi: 10.1093/molehr/2.5.317.

O'Toole, C. M. B., Roldan, E. R. S., Fraser, L. R., Toole, C. M. B. ., Roldan, E. R. S. y Fraser, L. R. (1996) «Protein kinase C activation during progesterone-stimulated acrosomal exocytosis in human spermatozoa.», *Molecular human reproduction*. Oxford University Press (OUP), 2(12), pp. 921-7. doi: 10.1093/molehr/2.12.921.

O'Toole, C. M. B., Roldan, E. R. S. y Fraser, L. R. (1996) «Role for Ca<sup>2+</sup> channels in the signal transduction pathway leading to acrosomal exocytosis in human spermatozoa», *Molecular Reproduction and Development*, 45(2), pp. 204-211. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199610)45:2<204::AID-MRD13>3.0.CO;2-0.

Ohzu, E. y Yanagimachi, R. (1982) «Acceleration of acrosome reaction in hamster spermatozoa by lyssolecithin», *Journal of Experimental Zoology*, 224(2), pp. 259-263. doi: 10.1002/jez.1402240216.

Olds-Clarke, P. (1990) «Variation in the quality of sperm motility and its relationship to capacitation», en B. D. Bavister, J. Cummins, and E. R. S. R. (ed.) *Fertilization in Mammals*. Norwell, Massachusetts.: Serono Symposia, pp. 91-100.

Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A. y de, C. G. (2006) «El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización», *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(4), pp. 426-436. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-06902006000400008&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-06902006000400008&script=sci_arttext&tlng=en)

Orta, G., Vega-Beltran, J. L., Hidalgo, D., Santi, C. M., Visconti, P. y Darszon, A. (2018) «CatSper channels are regulated by protein kinase A.», *The Journal of biological chemistry*. doi: 10.1074/jbc.RA117.001566.

Oura, C. y Toshimori, K. (1990) «Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes», *International review of cytology*, 122, pp. 105-51. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2246115>

Pahune, P. P., Choudhari, A. R. y Muley, P. A. (2013) «The total antioxidant power of semen and its correlation with the fertility potential of human male subjects», *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 7(6), pp. 991-5. doi: 10.7860/JCDR/2013/4974.3040.

## BIBLIOGRAFIA

- Parks, J. E., and Ehrenwald, E. (1990) «Cholesterol efflux from mammalian sperm and its potential role in capacitation», en B. D. Bavister, J. C. y Roldan, and E. R. S. (eds.) "Fertilization in Mammals". Serono Sym. Norwell, Massachusetts, pp. 155-168.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J., Winer, M. A. y First, N. L. (1988) «Capacitation of Bovine Sperm by Heparin<sup>1</sup>», *Biology of Reproduction*. Oxford University Press (OUP), 38(5), pp. 1171-1180. doi: 10.1095/biolreprod38.5.1171.
- Paudel, B., Gervasi, M. G., Porambo, J., Caraballo, D. A., Tourzani, D. A., Mager, J., Platt, M. D., Salicioni, A. M. y Visconti, P. E. (2019) «Sperm capacitation is associated with phosphorylation of the testis-specific radial spoke protein Rsp6a», *Biology of Reproduction*, 100(2), pp. 440-454. doi: 10.1093/biolre/i0y202.
- Peña, F. J., Saravia, F., Johannisson, a, Walgren, M. y Rodríguez-Martínez, H. (2005) «A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa.», *International journal of andrology*, 28(2), pp. 107-14. doi: 10.1111/j.1365-2605.2005.00512.x.
- Pereira, R., Sá, R., Barros, A. y Sousa, M. (2017) «Major regulatory mechanisms involved in sperm motility», *Asian Journal of Andrology*, 19(1), pp. 5-14. doi: 10.4103/1008-682x.167716.
- Peris-Frau P, Martín-Maestro A, Iniesta-Cuerda M, Sánchez-Ajofrín I, Mateos-Hernández L, Garde JJ, Villar M, Soler AJ. (2019) «Freezing-Thawing Procedures Remodel the Proteome of Ram Sperm before and after In Vitro Capacitation». *International Journal of Molecular Sciences* (20):4596. doi: 10.3390/ijms20184596.
- Piehler, E., Petrunkina, A. M., Ekhlesi-Hundrieser, M. y Töpfer-Petersen, E. (2006) «Dynamic quantification of the tyrosine phosphorylation of the sperm surface proteins during capacitation», *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 69(10), pp. 1062-70. doi: 10.1002/cyto.a.20338.
- Pintado, B., de la Fuente, J. y Roldan, E. R. (2000) «Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability.», *Journal of reproduction and fertility*, 118(1), pp. 145-52. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10793636>
- Plante, M., de Lamirande, E. y Gagnon, C. (1994) «Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility», *Fertility and sterility*, 62, pp. 387-393.
- Du Plessis, S. S., Agarwal, A., Halabi, J. y Tvrdá, E. (2015) «Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function», *Journal of assisted reproduction and genetics*, 32(4), pp. 509-20. doi: 10.1007/s10815-014-0425-7.
- Potts, R., Notarianni, L y Jefferies, T. (2000) «Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation», *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 447(2), pp. 249-256. doi: 10.1016/S0027-5107(99)00215-8.
- Prien, S. D., Lox, C. D., Messer, R. H. y DeLeon, F. D. (1990) «Seminal concentrations of total and ionized calcium from men with normal and decreased motility», *Fertility and sterility*, 54(1), pp. 171-2. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2358084>

## BIBLIOGRAFIA

- Publicover, S. J., Giojalas, L. C., Teves, M. E., De Oliveira, G. S. M. M. H., Garcia, A. A. M., Barratt, C. L. R. y Harper, C. V. (2008) «Ca<sup>2+</sup> signalling in the control of motility and guidance in mammalian sperm», *Frontiers in Bioscience. Front Biosci*, pp. 5623-5637. doi: 10.2741/3105.
- Punjabi, U., Van Mulders, H., Goovaerts, I., Peeters, K., Clasen, K., Janssens, P., Zemtsova, O. y De Neubourg, D. (2018) «Sperm DNA fragmentation in the total and vital fractions before and after density gradient centrifugation: Significance in male fertility diagnosis», *Clinical Biochemistry*, 62, pp. 47-54. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2018.05.011.
- Purdy, P. H. (2008) «Ubiquitination and its influence in boar sperm physiology and cryopreservation», *Theriogenology*, 70(5), pp. 818-826. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.05.044.
- Qi, C., Zhu, Y.-J., Lu, B.-Q., Zhao, X.-Y., Zhao, J., Chen, F. y Wu, J. (2014) «ATP-stabilized amorphous calcium carbonate nanospheres and their application in protein adsorption.», *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 10(10), pp. 2047-56. doi: 10.1002/sml.201302984.
- Qi, H., Moran, M. M., Navarro, B., Chong, J. A., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Kirichok, Y., Ramsey, I. S., Quill, T. A. y Clapham, D. E. (2007) «All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(4), pp. 1219-1223. doi: 10.1073/pnas.0610286104.
- R de Vriese., S., B., A. C. y Agarwal, A. (2003) «Significance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility», en R de Vriese., S. y B., A. C. (eds.) *Male Fertility and Lipid Metabolism*. AOCs, pp. 157-183. Disponible en: [http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=rDnCMg8ZoGkC&oi=fnd&pg=PA157&dq=Significance+of+oxidative+stress+and+sperm+chromatin+damage+in+male+infertility&ots=5wsPOaw1Ng&sig=gM8tuHeg\\_z5HbXaDhMBR25M54Wk](http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=rDnCMg8ZoGkC&oi=fnd&pg=PA157&dq=Significance+of+oxidative+stress+and+sperm+chromatin+damage+in+male+infertility&ots=5wsPOaw1Ng&sig=gM8tuHeg_z5HbXaDhMBR25M54Wk)
- Rasool, M., Zaigham, K., Malik, A., Naseer, M. I., Umm-E-Habiba, Manan, A., Qazi, M. H. y Asif, M. (2014) «Potential reproductive health effects and oxidative stress associated with exposure to potassium dichromate (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) and magnesium sulphate (MgSO<sub>4</sub>) in male mice.», *Pakistan journal of medical sciences*, 30(4), pp. 819-23. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25097524>
- Rathke, C., Baarends, W. M., Awe, S. y Renkawitz-Pohl, R. (2014) «Chromatin dynamics during spermiogenesis», *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1839(3), pp. 155-168. doi: 10.1016/j.bbagr.2013.08.004.
- Ren, D. y Xia, J. (2010) «Calcium Signaling Through CatSper Channels in Mammalian Fertilization», *Physiology*, 25(3), pp. 165-175. doi: 10.1152/physiol.00049.2009.
- Revelli, A., Costamagna, C., Moffa, F., Aldieri, E., Ochetti, S., Bosia, A., Massobrio, M., Lindblom, B. y Ghigo, D. (2001) «Signaling pathway of nitric oxide-induced acrosome reaction in human spermatozoa.», *Biology of reproduction*, 64(6), pp. 1708-12. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369599>
- Ricci, G., Perticarari, S., Boscolo, R., Montico, M., Guaschino, S. y Presani, G. (2009) «Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient-density centrifugation technique», *Fertility and sterility. American Society for Reproductive Medicine*, 91(2), pp. 632-8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.11.068.

## BIBLIOGRAFIA

- Riffo, M., Leiva, S. y Astudillo, J. (1992) «Effect of zinc on human sperm motility and the acrosome reaction», *International Journal of Andrology*, 15(3), pp. 229-237. doi: 10.1111/j.1365-2605.1992.tb01343.x.
- Roldan, E. R. y Fragio, C. (1993) «Phospholipase A2 activation and subsequent exocytosis in the Ca<sup>2+</sup>/ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa», *The Journal of Biological Chemistry*, 268(19), pp. 13962-13970. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8314762>.
- Roldan, E. R. y Harrison, R. A. (1993) «Diacylglycerol in the exocytosis of the mammalian sperm acrosome», *Biochemical Society transactions*, 21(2), pp. 284-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- Roldan, E. R. y Mollinedo, F. (1991) «Diacylglycerol stimulates the Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent phospholipase A2 of ram spermatozoa», *Biochemical and biophysical research communications*, 176(1), pp. 294-300. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2018523>
- Roldan, E. R. y Murase, T. (1994) «Polyphosphoinositide-derived diacylglycerol stimulates the hydrolysis of phosphatidylcholine by phospholipase C during exocytosis of the ram sperm acrosome. Effect is not mediated by protein kinase C.», *The Journal of Biological Chemistry*, 269(38), pp. 23583-23589. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8089126>.
- Roldan, E. R., Murase, T. y Shi, Q. X. (1994) «Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida», *Science (New York, N.Y.)*, 266(5190), pp. 1578-81. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7985030>
- Roldan, E. R. S. y Fragio, C. (2015) «Diacylglycerols stimulate phospholipase A 2 and subsequent exocytosis in ram spermatozoa. Evidence that the effect is not mediated via protein kinase C», *Biochemical Journal*, 297(1), pp. 225-232. doi: 10.1042/bj2970225.
- Roldan, E. R. S. y Harrison, R. A. P. (1990) «Diacylglycerol and phosphatidate production and the exocytosis of the sperm acrosome», *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 172(1), pp. 8-15. doi: 10.1016/S0006-291X(05)80165-2.
- Roldan, E. R. S. y Shi, Q. X. (2007) «Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis», *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 12, pp. 89-104. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17127285>
- Roldan, E. R. y Vazquez, J. M. (1996) «Bicarbonate/CO<sub>2</sub> induces rapid activation of phospholipase A2 and renders boar spermatozoa capable of undergoing acrosomal exocytosis in response to progesterone», *FEBS letters*, 396(2-3), pp. 227-32. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8914992>
- Rossato, M., Di Virgilio, F., Rizzuto, R., Galeazzi, C. y Foresta, C. (2001) «Intracellular calcium store depletion and acrosome reaction in human spermatozoa: role of calcium and plasma membrane potential», *Molecular human reproduction*, 7(2), pp. 119-28. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160837>
- Rossi, A., Pizzo, P. y Filadi, R. (2019) «Calcium, mitochondria and cell metabolism: A functional triangle in bioenergetics», *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1866(7), pp. 1068-1078. doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.10.016.

## BIBLIOGRAFIA

- Roy, S. C. y Atreja, S. K. (2008a) «Effect of reactive oxygen species on capacitation and associated protein tyrosine phosphorylation in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa», *Animal reproduction science*, 107(1-2), pp. 68-84. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.06.024.
- Roy, S. C. y Atreja, S. K. (2008b) «Production of superoxide anion and hydrogen peroxide by capacitating buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa», *Animal reproduction science*, 103(3-4), pp. 260-70. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.01.001.
- Ryter, S. W., Kim, H. P., Hoetzel, A., Park, J. W., Nakahira, K., Wang, X. y Choi, A. M. K. (2007) «Mechanisms of cell death in oxidative stress.», *Antioxidants & redox signaling*, 9(1), pp. 49-89. doi: 10.1089/ars.2007.9.49.
- Sakkas, D., Leppens-Luisier, G., Lucas, H., Chardonens, D., Campana, a, Franken, D. R. y Urner, F. (2003) «Localization of tyrosine phosphorylated proteins in human sperm and relation to capacitation and zona pellucida binding.», *Biology of reproduction*, 68(4), pp. 1463-9. doi: 10.1095/biolreprod.102.011023.
- Salicioni, A. M., Platt, M. D., Wertheimer, E. V., Arcelay, E., Allaire, A., Sosnik, J. y Visconti, P. E. (2007) «Signalling pathways involved in sperm capacitation.», *Society of Reproduction and Fertility supplement*, pp. 245-259.
- Samanta, L., Parida, R., Dias, T. R. y Agarwal, A. (2018) «The enigmatic seminal plasma: a proteomics insight from ejaculation to fertilization», *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), p. 41. doi: 10.1186/s12958-018-0358-6.
- Sánchez-Cárdenas, C., Montoya, F., Navarrete, F. A., Hernández-Cruz, A., Corkidi, G., Visconti, P. E. y Darszon, A. (2018) «Intracellular Ca<sup>2+</sup> threshold reversibly switches flagellar beat off and on†», *Biology of Reproduction*. doi: 10.1093/biolre/joy132.
- Sánchez, M. V., Bastir, M. y Roldan, E. R. S. (2013) «Geometric morphometrics of rodent sperm head shape», *PLoS ONE*, 8(11), p. e80607. doi: 10.1371/journal.pone.0080607.
- Šandera, M., Albrecht, T. y Stopka, P. (2013) «Variation in apical hook length reflects the intensity of sperm competition in murine rodents», *PLoS one*, 8(7), p. e68427. doi: 10.1371/journal.pone.0068427.
- Shaltiel, G., Bar-David, E., Meiron, O. E., Waltman, E., Shechter, A., Aflalo, E. D., Stepensky, D., Berman, A., Martin, B. R., Weaver, C. M. y Sagi, A. (2013) «Bone loss prevention in ovariectomized rats using stable amorphous calcium carbonate», *Health. Scientific Research Publishing*, 05(07), pp. 18-29. doi: 10.4236/health.2013.57A2003.
- Sharma, R. K. y Agarwal, A. (1996) «Role of reactive oxygen species in male infertility», *Urology*, 48(6), pp. 835-850.
- Shi, Q.-X. y Roldan, E. R. S. (1995) «Bicarbonate/CO<sub>2</sub> is not Required for Zona Pellucida- or Progesterone-Induced Acrosomal Exocytosis of Mouse Spermatozoa but is Essential for Capacitation», *Biology of Reproduction*, 52(3), pp. 540-546. doi: 10.1095/biolreprod52.3.540.
- Shi, Q., Chen, W. Y., Yuan, Y. Y., Mao, L. Z., Yu, S. Q., Chen, A. J., Ni, Y. y Roldan, E. R. S. (2005) «Progesterone primes zona pellucida-induced activation of phospholipase A<sub>2</sub> during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa», *Journal of Cellular Physiology*, 205(3), pp. 344-354. doi: 10.1002/jcp.20426.

## BIBLIOGRAFIA

- Shi, X., Wang, T., Qiu, Z. L., Li, K., Li, L., Chan, C. P. S., Chan, S. M., Li, T.-C. y Quan, S. (2016) «Effects of mechanical stresses on sperm function and fertilization rate in mice», *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 62(2), pp. 152-159. doi: 10.3109/19396368.2015.1115915.
- Shi Y, Buffenstein R, Pulliam DA, V. R. H. (2010) «Comparative studies of oxidative stress and mitochondrial function in aging», *Integr Comp Biol*, 50(50), pp. 869-879. doi: 10.1093/icb/icq079.
- Si, Y. (1999) «Role of Tyrosine Phosphorylation of Flagellar Proteins in Hamster Sperm Hyperactivation», *Biology of Reproduction*, 61(1), pp. 240-246. doi: 10.1095/biolreprod61.1.240.
- Sidhu, K. S. y Guraya, S. S. (1989) «Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in mammalian spermatozoa», *International review of cytology*, 118, pp. 231-80. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2691427>
- Sørensen, M. B., Bergdahl, I. A., Hjøllund, N. H., Bonde, J. P., Stoltenberg, M. y Ernst, E. (1999) «Zinc, magnesium and calcium in human seminal fluid: relations to other semen parameters and fertility», *Molecular human reproduction*, 5(4), pp. 331-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10321804>
- Soriano-Úbeda, C., Romero-Aguirregomezcorta, J., Matás, C., Visconti, P. E. y García-Vázquez, F. A. (2019) «Manipulation of bicarbonate concentration in sperm capacitation media improves in vitro fertilisation output in porcine species», *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10(1), p. 19. doi: 10.1186/s40104-019-0324-y.
- Sousa, A. P., Amaral, A., Baptista, M., Tavares, R., Caballero Campo, P., Caballero Peregrín, P., Freitas, A., Paiva, A., Almeida-Santos, T. y Ramalho-Santos, J. (2011) «Not all sperm are equal: functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential.», *PLoS one*, 6(3), p. e18112. doi: 10.1371/journal.pone.0018112.
- Stewart, T. A. y Davis, F. M. (2019) «An element for development: Calcium signaling in mammalian reproduction and development», *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1866(7), pp. 1230-1238. doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.02.016.
- Stival, C., Puga Molina, L. del C., Paudel, B., Buffone, M. G., Visconti, P. E. y Krapf, D. (2016) «Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Sperm», en *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, pp. 93-106. doi: 10.1007/978-3-319-30567-7\_5.
- Stock, C. E. y Fraser, L. R. (1989) «Divalent cations, capacitation and the acrosome reaction in human spermatozoa», *Journal of reproduction and fertility*, 87(2), pp. 463-78. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2600903>
- Storey, B. T., Hourani, C. L. y Kim, J. B. (1992) «A transient rise in intracellular Ca<sup>2+</sup> is a precursor reaction to the zona pellucida-induced acrosome reaction in mouse sperm and is blocked by the induced acrosome reaction inhibitor 3-quinuclidinyl benzilate.», *Molecular reproduction and development*, 32(1), pp. 41-50. doi: 10.1002/mrd.1080320108.
- Straub, D. A. (2007) «Calcium Supplementation in Clinical Practice: A Review of Forms, Doses, and Indications», *Nutrition in Clinical Practice*, 22(3), pp. 286-296. doi: 10.1177/0115426507022003286.
- Suarez, S. S., Drost, M., Redfern, K., and Gottlieb, W. (1990) «Sperm motility in the oviduct», en B. D. Bavister, J. Cummins, and E. R. S. R. (ed.) *Fertilization in Mammals*. Serono Sym. Norwell, Massachusetts., pp. 111–124.



## BIBLIOGRAFIA

- Suarez, S. S., Katz, D. F., Owen, D. H., Andrew, J. B. y Powell, R. L. (1991) «Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm», *Biology of reproduction*, 44(2), pp. 375-81. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2009336>
- Suarez, S. S. (2008) «Control of hyperactivation in sperm», *Human Reproduction Update*, 14(6), pp. 647-657. doi: 10.1093/humupd/dmn029.
- Suarez, S. S. y Pacey, A. A. (2006) «Sperm transport in the female reproductive tract», *Human Reproduction Update*, 12(1), pp. 23-37. doi: 10.1093/humupd/dmi047.
- Suarez, S. S. y Wu, M. (2016) «Microfluidic devices for the study of sperm migration», *Molecular Human Reproduction*, 23(4), pp. 227-234. doi: 10.1093/molehr/gaw039.
- Sun, X., Zhu, Y., Wang, L., Liu, H., Ling, Y., Li, Z. y Sun, L. (2017) «The Catsper channel and its roles in male fertility: a systematic review», *Reproductive Biology and Endocrinology*, 15(1), p. 65. doi: 10.1186/s12958-017-0281-2.
- Sundqvist, T. (1991) «Bovine aortic endothelial cells release hydrogen peroxide», *Journal of Cell Physiology*, 148, pp. 152-156.
- Sutovsky, P., Kerns, K., Zigo, M. y Zuidema, D. (2019) «Boar semen improvement through sperm capacitation management, with emphasis on zinc ion homeostasis», *Theriogenology*, 137, pp. 50-55. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.05.037.
- Tartarin, P., Guibert, E., Touré, A., Ouiste, C., Leclerc, J., Sanz, N., Brière, S., Dacheux, J. L., Delaleu, B., McNeilly, J. R., McNeilly, A. S., Brillard, J. P., Dupont, J., Foretz, M., Viollet, B. y Froment, P. (2012) «Inactivation of AMPK $\alpha$ 1 induces asthenozoospermia and alters spermatozoa morphology», *Endocrinology*, 153(7), pp. 3468-3481. doi: 10.1210/en.2011-1911.
- Teves, M. E., Guidobaldi, H. A., Uñates, D. R., Sanchez, R., Miska, W., Publicover, S. J., Garcia, A. A. M. y Giojalas, L. (2009) «Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone», *PLoS ONE*. *PLoS One*, 4(12). doi: 10.1371/journal.pone.0008211.
- Thannickal, V. J. y Fanburg, B. L. (2000) «Reactive oxygen species in cell signaling», *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 279(6), pp. L1005-28. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11076791>
- Tomlinson, M. J., East, S. J., Barratt, C. L., Bolton, A. E. y Cooke, I. D. (1992) «Preliminary communication: possible role of reactive nitrogen intermediates in leucocyte-mediated sperm dysfunction.», *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*, 27(1-2), pp. 89-92. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1610494>
- Toole, C. M. B. O., Arnoult, C., Darszon, A., Steinhardt, R. A. y Florman, H. M. (2000) «Ca (2+) Entry through Store-operated Channels in Mouse Sperm Is Initiated by Egg ZP3 and Drives the Acrosome Reaction», *Molecular biology of the cell*, 11(May), pp. 1571-1584.
- Tourmente, M., Gomendio, M., Roldan, E. R. S., Giojalas, L. C. y Chiaraviglio, M. (2009) «Sperm competition and reproductive mode influence sperm dimensions and structure among snakes», *Evolution*, 63(10), pp. 2513-2524. doi: 10.1111/j.1558-5646.2009.00739.x.
- Tourmente, M., Villar-Moya, P., Varea-Sánchez, M., Luque-Larena, J. J., Rial, E. y Roldan, E. R. S. (2015) «Performance of Rodent Spermatozoa Over Time Is Enhanced by Increased ATP Concentrations: The Role of Sperm Competition<sup>1</sup>», *Biology of reproduction*, 93(3), p. 64. doi: 10.1095/biolreprod.114.127621.

## BIBLIOGRAFIA

Tourmente, M., Varea-Sánchez, M. y Roldan, E. R. S. (2019) «Faster and more efficient swimming: Energy consumption of murine spermatozoa under sperm competition», *Biology of Reproduction*, 100(2), pp. 420-428. doi: 10.1093/biolre/i0y197.

Tourmente, M., Zarka-Trigo, D. y Roldan, E. R. S. (2016) «Is the hook of muroid rodent's sperm related to sperm train formation?», *Journal of Evolutionary Biology*, 29(6), pp. 1168-1177. doi: 10.1111/jeb.12857.

Toyoda, Y. y Yokoyama, M. (2016) «The Early History of the TYH Medium for in vitro Fertilization of Mouse Ova», *Journal of Mammalian Ova Research. Japanese Society of Mammalian Ova Research*, 33(1), pp. 3-10. doi: 10.1274/jmor.35.71.

Toyoda, Y., Yokoyama, M. y Hosi, T. (1971) «Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. I. In vitro fertilization of eggs by fresh epididymal sperm.», *Jpn. J. Anim. Reprod*, 16(1), pp. 147-151.

Toyoda, Y., Yokoyama, M y Hosi, T. (1971) «Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. II. Effects of in vitro pre-incubation of spermatozoa on time of sperm penetration of mouse eggs in vitro.», *Jpn. J. Anim. Reprod*, 16(1), pp. 152-157.

Travis, A. J., Jorgez, C. J., Merdiushev, T., Jones, B. H., Dess, D. M., Diaz-Cueto, L., Storey, B. T., Kopf, G. S. y Moss, S. B. (2001) «Functional Relationships between Capacitation-dependent Cell Signaling and Compartmentalized Metabolic Pathways in Murine Spermatozoa.», *The Journal of biological chemistry*, 276(10), pp. 7630-7636. doi: 10.1074/jbc.M006217200.

Tulsiani, D. R., Abou-Haila, A., Loeser, C. R. y Pereira, B. M. (1998) «The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization», *Experimental cell research*, 240(2), pp. 151-64. doi: 10.1006/excr.1998.3943.

Tulsiani, D. R. y Abou-Haila, A. (2001) «Mammalian sperm molecules that are potentially important in interaction with female genital tract and egg vestments», *Zygote (Cambridge, England)*, 9(1), pp. 51-69. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11273033>

Tulsiani, D. R. P., Zeng, H.-T. y Abou-Haila, A. (2007) «Biology of sperm capacitation: evidence for multiple signalling pathways», *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 63, pp. 257-72. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17566278>

Tulsiani, D. R., Yoshida-Komiya, H. y Araki, Y. (1997) «Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event», *Biology of reproduction*, 57(3), pp. 487-94. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9282981>

Turner, R. M. (2006) «Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation», *Reproduction fertility and development*, 18(1-2), pp. 25-38. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16478600>.

Tvrda, E., López-Fernández, C., Sánchez-Martín, P. y Gosálvez, J. (2018) «Sperm DNA fragmentation in donors and normozoospermic patients attending for a first spermiogram: Static and dynamic assessment», *Andrologia. Blackwell Publishing Ltd*, 50(4). doi: 10.1111/and.12986.

Urner, F., Leppens-Luisier, G. y Sakkas, D. (2001) «Protein Tyrosine Phosphorylation in Sperm During Gamete Interaction in the Mouse: The Influence of Glucose», *Biology of Reproduction. Oxford University Press (OUP)*, 64(5), pp. 1350-1357. doi: 10.1095/biolreprod64.5.1350.

## BIBLIOGRAFIA

- Urner, F. y Sakkas, D. (1996a) «Glucose is not essential for the occurrence of sperm binding and zona pellucida-induced acrosome reaction in the mouse», *International journal of andrology*, 19(2), pp. 91-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8737039>
- Urner, F. y Sakkas, D. (1996b) «Glucose participates in sperm-oocyte fusion in the mouse», *Biology of reproduction*, 55(4), pp. 917-22. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8879509>
- Urner, F. y Sakkas, D. (2003) «Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa», *Reproduction*, 125(1), pp. 17-26. doi: 10.1530/rep.0.1250017.
- Vallee, B. L. y Falchuk, K. H. (1993) «The biochemical basis of zinc physiology», *Physiological Reviews*, 73(1), pp. 79-118. doi: 10.1152/physrev.1993.73.1.79.
- Valsa, J., Skandhan, K. P., Khan, P. S., Sumangala, B. y Gondalia, M. (2012) «Split ejaculation study: Semen parameters and calcium and magnesium in seminal plasma», *Central European Journal of Urology. Polish Urological Association*, 65(4), pp. 216-218. doi: 10.5173/ceju.2012.04.art7.
- Valsa, J., Skandhan, K. P., Khan, P. S., Avni, K. P. S., Amith, S. y Gondalia, M. (2015) «Calcium and magnesium in male reproductive system and in its secretion. I. Level in normal human semen, seminal plasma and spermatozoa», *Urologia*, 82(3), pp. 174-8. doi: 10.5301/urologia.5000039.
- Valsa, J., Skandhan, K. P., Sumangala, B., Amith, S. y Skandhan Avni, K. P. (2016) «Effect of Different Timings of the Day on Semen and Calcium and Magnesium in it», *Urologia Journal*, 83(4), pp. 207-210. doi: 10.5301/uro.5000029.
- Vandevoort, C. A., Tollner, T. L. y Overstreet, J. W. (1994) «Separate effects of caffeine and dbcAMP on macaque sperm motility and interaction with the zona pellucida», *Molecular Reproduction and Development*, 37(3), pp. 299-304. doi: 10.1002/mrd.1080370309.
- Varea-Sánchez, M., Tourmente, M., Bastir, M. y Roldan, E. R. S. (2016) «Unraveling the Sperm Bauplan: Relationships Between Sperm Head Morphology and Sperm Function in Rodents», *Biology of Reproduction*, 95(25), pp. 1-9. doi: 10.1095/biolreprod.115.138008.
- Vernet, P., Fulton, N., Wallace, C., Aitken, R. J. y Pascal, B. (2001) «Analysis of a plasma membrane redox system in rat epididymal spermatozoa», *Biology of reproduction*, 65, pp. 1102-1113.
- Vicens Sánchez, A. (2014) Papel de la selección sexual post-cópula sobre la evolución de genes reproductivos en mamíferos. UAM. Editado por Departamento de Biología Molecular; CSIC. Museo Nacional de Ciencias Naturales. Disponible en: <https://repositorio.uam.es/handle/10486/663641>
- Visconti, E., Galantino-homer, H., Moore, G. D., Bailey, J. L., Ning, X., Fornes, M. y Kopf, G. S. (1998) «The molecular Basis of Sperm Capacitation», *Journal of Andrology*, 19(2), pp. 242-248.
- Visconti, P. E., Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D., Olds-Clarke, P. y Kopf, G. S. (1995) «Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation», *Development (Cambridge, England)*, 121(4), pp. 1129-37. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7743926>
- Visconti, P. E., Moore, G. D., Bailey, J. L., Leclerc, P., Connors, S. A., Pan, D., Olds-clarke, P. y Kopf, G. S. (1995) «Capacitation of mouse spermatozoa pathway II: Protein tyrosine

## BIBLIOGRAFIA

phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway», *Development* (Cambridge, England), 121(4), pp. 1139-1150. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7538069>

Visconti, P. E., Ning, X., Fornés, M. W., Alvarez, J. G., Stein, P., Connors, S. A. y Kopf, G. S. (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(2), pp. 429-43. doi: 10.1006/dbio.1999.9428.

Visconti, P. E., Westbrook, V. a, Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S. y Diekman B (2002) «Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity», *Journal of reproductive immunology*, 53(1-2), pp. 133-50. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11730911>.

Visconti, P. E. (2009) «Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(3), pp. 667-668. doi: 10.1073/pnas.0811895106.

Visconti, P. E., Krapf, D., de la Vega-Beltrán, J. L., Acevedo, J. J. y Darszon, A. (2011) «Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation», *Asian journal of andrology*, 13(3), pp. 395-405. doi: 10.1038/aja.2010.69.

Visconti, P. y Kopf, G. S. (1998) «Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation», *Biology of reproduction*, 59(1), pp. 1-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9674985>

Walczak–Jedrzejowska, R., Wolski, J. K. y Slowikowska–Hilczer, J. (2013) «The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility», *Central European Journal of Urology*, 65(1), pp. 60-67. doi: 10.5173/cej.2013.01.art19.

Wang, Y.-X., Wang, P., Feng, W., Liu, C., Yang, P., Chen, Y.-J., Sun, L., Sun, Y., Yue, J., Gu, L.-J., Zeng, Q. y Lu, W.-Q. (2017) «Relationships between seminal plasma metals/metalloids and semen quality, sperm apoptosis and DNA integrity», *Environmental Pollution*, 224, pp. 224-234. doi: 10.1016/j.envpol.2017.01.083.

Wang, Y., Zeigler, M. M., Lam, G. K., Hunter, M. G., Eubank, T. D., Khramtsov, V. V., Tridandapani, S., Sen, C. K. y Marsh, C. B. (2007) «The role of the NADPH oxidase complex, p38 MAPK, and Akt in regulating human monocyte/macrophage survival.», *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 36(1), pp. 68-77. doi: 10.1165/rcmb.2006-0165OC.

Waris, G. y Ahsan, H. (2006) «Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions», *Journal of carcinogenesis*, 5, p. 14. doi: 10.1186/1477-3163-5-14.

Watson, P. F. (1975) «Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa», *The Veterinary record*, 97(1), pp. 12-15. doi: 10.1136/vr.97.1.12.

Weiner, S., Levi-Kalisman, Y., Raz, S. y Addadi, L. (2003) «Biologically formed amorphous calcium carbonate», *Connective tissue research*, 44 Suppl 1, pp. 214-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12952200>

Whitaker, M. (2006) «Calcium at Fertilization and in Early Development», *Physiological Reviews*, 86(1), pp. 25-88. doi: 10.1152/physrev.00023.2005.

## BIBLIOGRAFIA

Williams, A. C. y Ford, W. C. L. (2001) «The Role of Glucose in Supporting Motility and Capacitation in Human Spermatozoa», *Journal of Andrology*, 22(4), pp. 680-695. doi: 10.1002/J.1939-4640.2001.TB02229.X.

Witte, T. S. y Schäfer-Somi, S. (2007) «Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa», *Animal Reproduction Science*, pp. 181-193. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.07.007.

Wolf, D. P., Vandevort, C. A., Meyer-Haas, G. R., Zelinski-Wooten, M. B., Hess, D. L., Baughman, W. L. y Stouffer, R. L. (1989) «In Vitro Fertilization and Embryo Transfer in the Rhesus Monkey1», *Biology of Reproduction*. Oxford University Press (OUP), 41(2), pp. 335-346. doi: 10.1095/biolreprod41.2.335.

Wong, W. Y., Flik, G., Groenen, P. M., Swinkels, D. W., Thomas, C. M., Copius-Peereboom, J. H., Merkus, H. M. y Steegers-Theunissen, R. P. (2001) «The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men», *Reproductive toxicology* (Elmsford, N.Y.), 15(2), pp. 131-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11297872>

Wroblewski, N., Schill, W. B. y Henkel, R. (2003) «Metal chelators change the human sperm motility pattern», *Fertility and Sterility*, 79(SUPPL. 3), pp. 1584-1589. doi: 10.1016/S0015-0282(03)00255-3.

Xia, J., Reigada, D., Mitchell, C. H. y Ren, D. (2007) «CATSPER channel-mediated Ca<sup>2+</sup> entry into mouse sperm triggers a tail-to-head propagation», *Biology of reproduction*, 77(3), pp. 551-9. doi: 10.1095/biolreprod.107.061358.

Xiang, L., Kong, W., Su, J., Liang, J., Zhang, G., Xie, L. L.-P., Zhang, R. R.-Q., Xie, L. L.-P., Xie, L. L.-P., Zhang, R. R.-Q. y Zhang, R. R.-Q. (2014) «Amorphous Calcium Carbonate Precipitation by Cellular Biomineralization in Mantle Cell Cultures of *Pinctada fucata*», *PLoS ONE*. Editado por S. Strack, 9(11), p. e113150. doi: 10.1371/journal.pone.0113150.

Xu, B., Hao, Z., Jha, K. N., Digilio, L., Urekar, C., Kim, Y. H., Pulido, S., Flickinger, C. J. y Herr, J. C. (2007) «Validation of a testis specific serine/threonine kinase [TSSK] family and the substrate of TSSK1 & 2, TSKS, as contraceptive targets», *Society of Reproduction and Fertility supplement*, pp. 87-101. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17566264>

Yanagida, K., Hoshi, K., Sato, A. y Burkman, L. (1990) «Automated semen analysis shows an increase in sperm concentration and motility with time in makler chambers having excess sample volume», *Human Reproduction*. Oxford University Press, 5(2), pp. 193-196. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137068.

Yanagimachi, R. (1970) «The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation», *Journal of reproduction and fertility*, 23(1), pp. 193-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5472441>

Yanagimachi, R. (1994a) «Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity», *Zygote* (Cambridge, England), 2(4), pp. 371-2. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8665172>

Yanagimachi, R. (1994b) «Mammalian fertilization», en Knobil E. and Neill, J. (ed.) *The Physiology of Reproduction*. Raven Pres. New York, pp. 189–317.

Yang, L., Chen, H.-X., Mu, X.-H., Liu, X.-Q., Song, X.-R. y Tian, W.-Y. (2017) «CatSper in sperm hyperactivation and male infertility: Advances in studies.», *Zhonghua nan ke xue = National*

## BIBLIOGRAFIA

journal of andrology, 23(8), pp. 751-756. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29726653>

Yániz, J. L., Silvestre, M. A., Santolaria, P. y Soler, C. (2018) «CASA-Mot in mammals: an update», *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6), p. 799. doi: 10.1071/RD17432.

Yeung, C. H. y Cooper, T. G. (2008) «Potassium channels involved in human sperm volume regulation--quantitative studies at the protein and mRNA levels», *Molecular reproduction and development*, 75(4), pp. 659-68. doi: 10.1002/mrd.20812.

Young, R. J. y Bodt, B. A. (1994) «Development of computer-directed methods for the identification of hyperactivated motion using motion patterns developed by rabbit sperm during incubation under capacitation conditions», *Journal of andrology*, 15(4), pp. 362-77. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7982805>

Yuan, Y., Mao, L., Shi, Q., Roldan, E. R. S., Chen, W., Yu, S., Zhuang, Y. y Xu, S. (2001) «GABA/progesterone-induced polyphosphoinositide (PPI) breakdown and its role in the acrosome reaction of guinea pig spermatozoain vitro», *Science in China Series C: Life Sciences*, 44(4), pp. 345-355. doi: 10.1007/BF02879601.

Yuan, Y. Y., Chen, W. Y., Shi, Q. X., Mao, L. Z., Yu, S. Q., Fang, X. y Roldan, E. R. S. (2003) «Zona Pellucida Induces Activation of Phospholipase A2 During Acrosomal Exocytosis in Guinea Pig Spermatozoa», *Biology of Reproduction*, 68(3), pp. 904-913. doi: 10.1095/biolreprod.102.005777.

Zhang, R., Chae, S., Lee, J. H. y Hyun, J. W. (2012) «The cytoprotective effect of butin against oxidative stress is mediated by the up-regulation of manganese superoxide dismutase expression through a PI3K/Akt/Nrf2-dependent pathway.», *Journal of cellular biochemistry*, 113(6), pp. 1987-97. doi: 10.1002/jcb.24068.

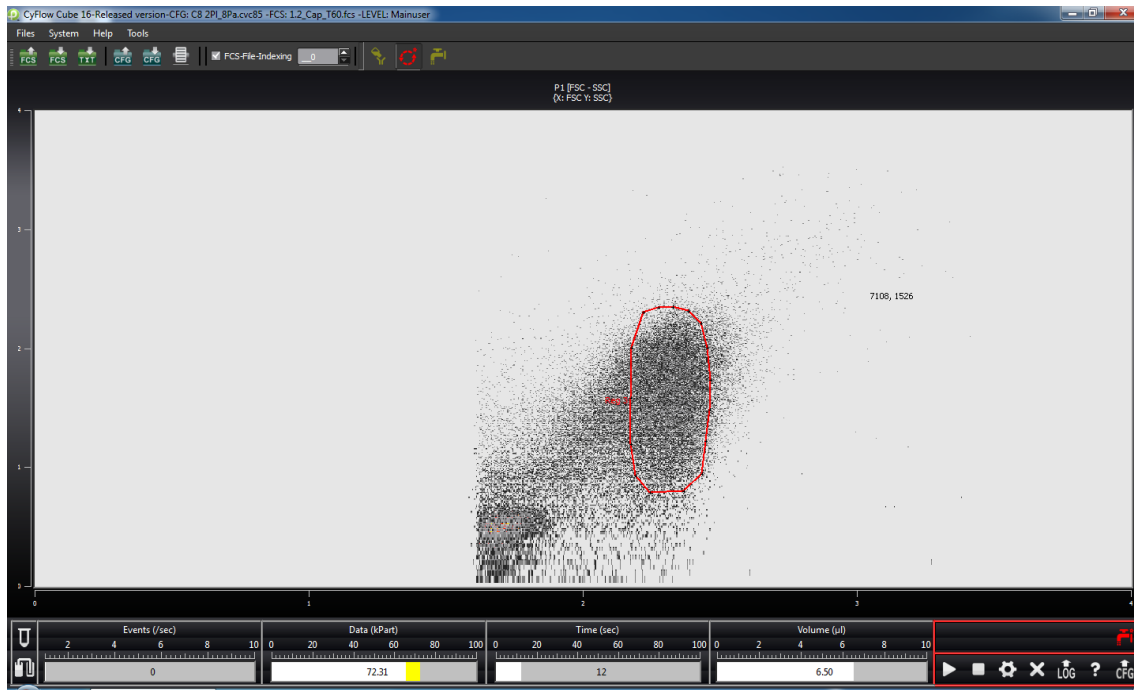
Zhao, J., Dong, X., Hu, X., Long, Z., Wang, L., Liu, Q., Sun, B., Wang, Q., Wu, Q. y Li, L. (2016) «Zinc levels in seminal plasma and their correlation with male infertility: A systematic review and meta-analysis», *Scientific Reports*, 6(1), p. 22386. doi: 10.1038/srep22386.

Zimmerman, S. y Sutovsky, P. (2009) «The sperm proteasome during sperm capacitation and fertilization», *Journal of reproductive immunology*, 83(1-2), pp. 19-25. doi: 10.1016/j.jri.2009.07.006.

Zini, A., de Lamirande, E. y Gagnon, C. (1993) «Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma», *International journal of andrology*, 16, pp. 183-188.

## ANEXOS

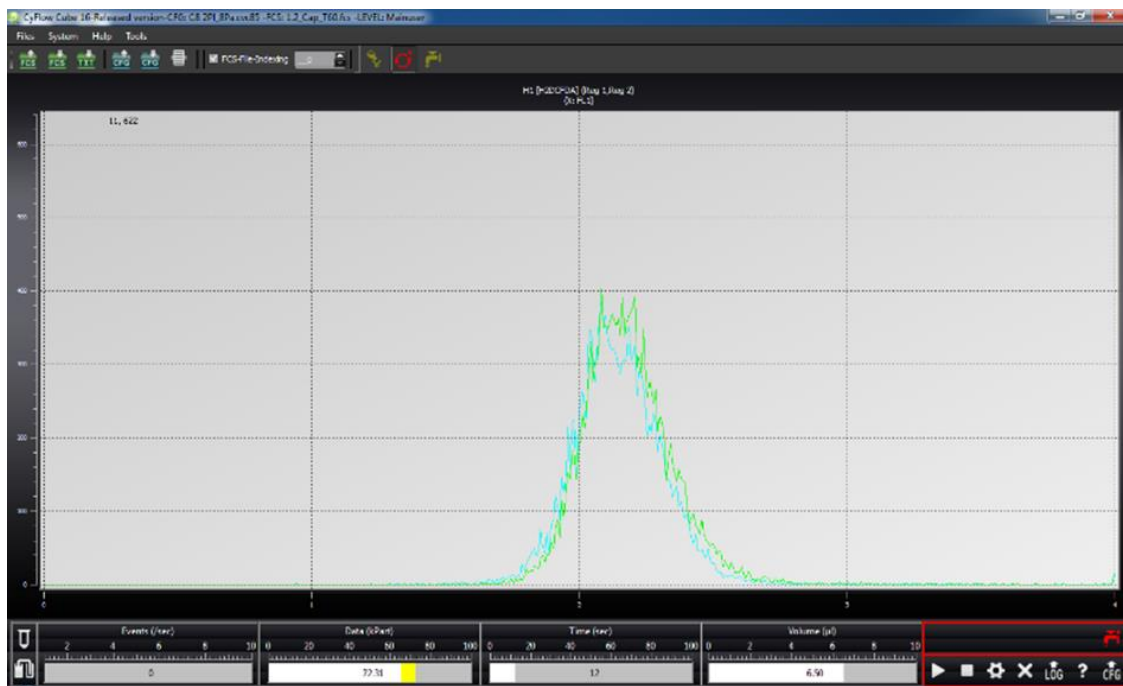
## Anexo 1: Regiones seleccionadas en los ensayos de citometría de flujo



**Figura S1:** Panel FSC/SSC, representa complejidad de la partícula (ordenadas) frente a tamaño de esta (abscisas). Genera la región 1 (espermatozoides) que hace de “sorter” en el resto de las regiones. Es decir, en el resto de los paneles (figuras S2 y S3), sólo se representan y analizan las partículas de la región 1.



**Figura S2:** Panel del canal 5, representa la señal de la sonda SYTOX™ Red Dead Cell Stain (abscisas), frente al número de partículas con dicha intensidad (ordenadas). Genera las subregiones 1 (vivos, color celeste) y 2 (muertos, color verde).



**Figura S3:** Panel del canal 1, representa la señal de la sonda H<sub>2</sub>DCFDA (abscisas), en la población de espermatozoides vivos (celeste) o muertos (verdes), frente al número de partículas con dicha intensidad (ordenadas).



**Anexo 2: Sintaxis del análisis estadístico realizado mediante SPSS.**

```

SORT CASES BY Class.
SPLIT FILE SEPARATE BY Class.
MIXED VARIABLE BY SUJETO MEDIA TREATMENT TIME
/CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1)
SINGULAR(0.0000000000
01) HCONVERGE(0,
ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)
/FIXED=MEDIA TREATMENT TIME MEDIA*TREATMENT MEDIA*TIME
TREATMENT*TIME MED
IA*TREATMENT*TIME | SSTYPE(3)
/METHOD=REML
/PRINT=DESCRIPTIVES
/RANDOM=SUJETO | COVTYPE(VC)
/SAVE=SEPREPRED
/EMMEANS=TABLES (MEDIA*TREATMENT*TIME) COMPARE (MEDIA) ADJ (LSD)
/EMMEANS=TABLES (MEDIA*TREATMENT*TIME) COMPARE (TREATMENT) ADJ (LSD)
/EMMEANS=TABLES (MEDIA*TREATMENT*TIME) COMPARE (TIME) ADJ (LSD) .

```

El código en azul configura al programa estadístico para ordenar las entradas de datos en base a la variable “*class*” (clase espermática), y realizar el análisis de cada conjunto de datos en base a dicha categoría. Este comando se excluyó en aquellos análisis del conjunto de espermatozoides (sin tener en cuenta la clase espermática), o cuando ésta no era necesaria (por ejemplo, en los análisis de viabilidad, acrosoma, citometría o intensidad relativa de la señal).

El código en verde permite hacer el análisis *post-hoc* cuando fue necesario, indicando en los resultados los niveles de significación estadística en base a pares de variables.

El código “CRITERIA=CIN(95)” implica que las diferencias significativas se establezcan con  $\alpha = 0.95$ .

**Anexo 3: Tablas resumen de los resultados.**

Las siguientes tablas suplementarias contienen los datos numéricos de todos los gráficos representados en la tesis. Los niveles de significación hacen referencia a  $\alpha = 0.95$  y fue calculado por el programa estadístico SPSS.

**Tabla S1.1:** Porcentaje de espermatozoides vivos

Medio	Tiempo (min)	No centrifugados	Centrifugados
NC	30	53,50 <sup>b</sup> ± 7,157	54,50 <sup>b</sup> ± 8,226
	60	53,75 <sup>b</sup> ± 10,587	45,75 <sup>ab</sup> ± 6,366
CAP	30	56,83 <sup>b</sup> ± 2,332	45,43 <sup>a</sup> ± 4,529
	60	60,00 <sup>b</sup> ± 6,412	66,29 <sup>b</sup> ± 3,642

Valor promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación en el porcentaje de espermatozoides vivos tras 60 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), en suspensiones espermáticas centrifugadas, o no. Los niveles de significación se indican mediante letras.

**Tabla S1.2:** Porcentaje de espermatozoides vivos y estatus acrosómico

Porcentaje de espermatozoides vivos con el acrosoma intacto, del total de espermatozoides vivos			
Tiempo (min)	No centrifugados	Centrifugados	
30	59 <sup>b</sup> ± 6,830	75,75 <sup>a</sup> ± 5,525	
60	57,75 <sup>b</sup> ± 5,960	51,75 <sup>b</sup> ± 5,255	
Porcentaje de espermatozoides vivos sin acrosoma, del total de espermatozoides vivos			
Tiempo (min)	No centrifugados	Centrifugados	
30	41 <sup>b</sup> ± 6,830	24,25 <sup>a</sup> ± 5,525	
60	42,25 <sup>b</sup> ± 5,960	48,25 <sup>b</sup> ± 5,255	

Valor promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación en el porcentaje de espermatozoides vivos con el acrosoma intacto (A), o sin acrosoma (B), tras 30 o 60 min de incubación en condiciones capacitantes (CAP), en suspensiones espermáticas centrifugadas, o no. Los niveles de significación se indican mediante letras.

**Tabla S1.3:** Porcentaje de espermatozoides móviles

Medio	Tiempo (min)	No centrifugado	Centrifugado
NC	15	-- ± --	65,00 <sup>ab</sup> ± 6,050
	30	76,00 <sup>b</sup> ± 8,550	80,00 <sup>b</sup> ± 6,850
	60	42,00 <sup>a</sup> ± 6,880	90,00 <sup>c</sup> ± 8,550
CAP	15	-- ± --	70,00 <sup>ab</sup> ± 4,940
	30	85,00 <sup>b</sup> ± 8,550	71,75 <sup>ab</sup> ± 4,280
	60	80,00 <sup>b</sup> ± 8,550	62,50 <sup>a</sup> ± 5,134

Valor promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación en el porcentaje de espermatozoides móviles a lo largo de la incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), en suspensiones espermáticas centrifugadas, o no. Los niveles de significación se indican mediante letras.

**Tabla S1.4:** Porcentaje de cada clase espermática, debida a la centrifugación

	Medio	Tiempo (min)	% Progresivos	% Intermedios	% Hiperactivos
NC	No centrifugado	30	78,26 <sup>d</sup> ± 8,750	16,15 <sup>bc</sup> ± 9,870	5,59 <sup>a</sup> ± 5,690
		60	78,26 <sup>d</sup> ± 8,103	16,15 <sup>bc</sup> ± 8,110	5,59 <sup>a</sup> ± 5,690
	Centrifugado	15	80,80 <sup>e</sup> ± 8,700	12,80 <sup>bc</sup> ± 9,840	6,40 <sup>ab</sup> ± 5,690
		30	63,47 <sup>d</sup> ± 6,500	29,65 <sup>c</sup> ± 7,200	6,87 <sup>ab</sup> ± 4,090
CAP	No centrifugado	60	60,97 <sup>d</sup> ± 5,000	24,97 <sup>c</sup> ± 5,390	14,05 <sup>b</sup> ± 2,990
		15	82,35 ± 8,103	11,76 <sup>b</sup> ± 9,870	5,88 <sup>a</sup> ± 5,690
	Centrifugado	60	58,57 <sup>d</sup> ± 8,750	24,29 <sup>c</sup> ± 9,870	17,14 <sup>b</sup> ± 5,690
		15	75,89 <sup>de</sup> ± 5,060	12,57 <sup>bc</sup> ± 5,420	11,53 <sup>b</sup> ± 2,993
	Centrifugado	30	71,35 <sup>d</sup> ± 4,490	14,14 <sup>b</sup> ± 4,498	14,51 <sup>b</sup> ± 2,993
		60	55,93 <sup>d</sup> ± 5,060	14,27 <sup>b</sup> ± 5,420	29,79 <sup>c</sup> ± 2,993

Valor promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación en el porcentaje de cada clase espermática (progresivos, intermedios o hiperactivos), a lo largo de la incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), en suspensiones espermáticas centrifugadas, o no. Los niveles de significación se indican mediante letras.

**Tabla S1.5.** Intensidad relativa de la señal.

	Tiempo (Min)	No centrifugados	Centrifugados
pPKA	30	94,45 <sup>a</sup> ± 2,528	97,91 <sup>ab</sup> ± 4,020
	60	100,00 <sup>b</sup> ± 4,485	102,00 <sup>b</sup> ± 3,280
pPY	30	40,00 <sup>a</sup> ± 18,925	46,95 <sup>a</sup> ± 15,720
	60	105,25 <sup>b</sup> ± 9,823	100,05 <sup>b</sup> ± 7,860

Valor promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la intensidad relativa de la señal de los *Blots* realizados para determinar la fosforilación de proteínas diana de la proteína quinasa A (pPKA) y de las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina (pY), a los 30 o 60 min de incubación en condiciones capacitantes, en suspensiones espermáticas centrifugadas, o no. Los niveles de significación, de cada tipo de proteínas, se indican mediante letras.

**Tabla S1.6:** Parámetros de la velocidad espermática y su variación debida a la centrifugación

Parámetro	MEDIO	TIEMPO (min)	Progresivos		Intermedios		Hiperactivos		Total vigorosos			
VAP	NC	15	--	±	--	--	±	--	--	±	--	
		30	No centrifugados	111,33	± 0,022	125,45	± 0,016	114,30	± 0,037	113,78	± 0,022	
		60	--	±	--	--	±	--	--	±	--	
		15	Centrifugados	123,80	± 0,020	118,44	± 0,015	98,89	± 0,028	121,52	± 0,020	
		30		113,13	± 0,022	128,40	± 0,011	101,82	± 0,029	116,99	± 0,019	
		60		111,05	± 0,022	125,45	± 0,010	100,92	± 0,024	115,60	± 0,017	
	CAP	15	No centrifugados	94,10	± 0,032	131,76	± 0,031	105,68	± 0,064	99,21	± 0,034	
		30		--	±	--	--	±	--	--	±	--
		60		92,36	± 0,032	116,86	± 0,019	99,12	± 0,032	99,47	± 0,029	
		15	Centrifugados	99,30	± 0,018	127,22	± 0,010	118,31	± 0,013	106,02	± 0,017	
		30		94,88	± 0,019	119,20	± 0,012	105,79	± 0,015	99,28	± 0,018	
		60		79,16	± 0,022	112,21	± 0,011	100,41	± 0,012	91,24	± 0,016	
VSL	NC	15	--	±	--	--	±	--	--	±	--	
		30	No centrifugados	93,96	± 0,031	92,21	± 0,025	53,71	± 0,054	91,43	± 0,031	
		60	--	±	--	--	±	--	--	±	--	
		15	Centrifugados	107,95	± 0,027	95,54	± 0,023	45,32	± 0,041	102,36	± 0,027	
		30		96,52	± 0,030	101,51	± 0,018	54,43	± 0,042	95,22	± 0,027	
		60		94,19	± 0,030	103,32	± 0,016	50,80	± 0,036	94,09	± 0,025	
	CAP	15	No centrifugados	70,42	± 0,044	92,18	± 0,046	33,22	± 0,094	70,79	± 0,048	
		30		--	±	--	--	±	--	--	±	--
		60		68,99	± 0,045	82,98	± 0,029	42,15	± 0,047	67,78	± 0,041	
		15	Centrifugados	77,53	± 0,025	85,70	± 0,018	44,60	± 0,019	74,67	± 0,023	
		30		73,23	± 0,026	81,76	± 0,020	46,53	± 0,022	70,96	± 0,025	
		60		54,52	± 0,030	70,13	± 0,018	45,23	± 0,016	54,46	± 0,023	
VCL	NC	15	--	±	--	--	±	--	--	±	--	
		30	No centrifugados	230,56	± 0,020	308,88	± 0,012	318,26	± 0,028	248,11	± 0,019	
		60	--	±	--	--	±	--	--	±	--	
		15	Centrifugados	265,50	± 0,018	314,23	± 0,011	267,68	± 0,021	271,88	± 0,017	
		30		250,68	± 0,020	329,44	± 0,009	286,76	± 0,022	276,89	± 0,017	
		60		264,45	± 0,020	328,67	± 0,008	287,56	± 0,018	290,28	± 0,015	
	CAP	15	No centrifugados	192,07	± 0,029	328,37	± 0,024	227,95	± 0,049	210,22	± 0,030	
		30		--	±	--	--	±	--	--	±	--
		60		202,42	± 0,029	285,07	± 0,015	252,13	± 0,024	231,02	± 0,025	
		15	Centrifugados	202,62	± 0,017	292,10	± 0,008	266,78	± 0,010	224,57	± 0,015	
		30		193,69	± 0,017	286,46	± 0,009	253,07	± 0,011	212,71	± 0,016	
		60		169,60	± 0,020	267,25	± 0,009	280,97	± 0,008	219,79	± 0,014	

Valor promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación de los parámetros de la velocidad tras 60 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), en suspensiones espermáticas centrifugadas o no.

**Tabla S1.7:** Parámetros de la trayectoria espermática y su variación debida a la centrifugación

Parámetro	MEDIO	TIEMPO (min)	Progresivos			Intermedios			Hiperactivos			Total vigorosos		
ALH	NC	15	--	±	--	--	±	--	--	±	--	--	±	--
		30	6,77	±	0,018	8,43	±	0,016	9,69	±	0,034	7,20	±	0,019
		60	--	±	--	--	±	--	--	±	--	--	±	--
		15	8,05	±	0,016	9,64	±	0,015	9,13	±	0,026	8,33	±	0,017
		30	7,33	±	0,018	9,68	±	0,013	8,30	±	0,027	8,10	±	0,017
		60	8,42	±	0,018	9,89	±	0,012	9,80	±	0,023	9,08	±	0,016
	CAP	15	6,68	±	0,026	10,95	±	0,029	8,45	±	0,059	7,29	±	0,028
		30	--	±	--	--	±	--	--	±	--	--	±	--
		60	7,01	±	0,026	9,53	±	0,019	8,85	±	0,030	7,94	±	0,025
		15	7,23	±	0,015	10,28	±	0,013	11,24	±	0,014	8,21	±	0,015
		30	7,63	±	0,016	10,99	±	0,014	11,21	±	0,015	8,50	±	0,016
		60	6,73	±	0,018	11,73	±	0,013	12,57	±	0,012	9,34	±	0,015
BCF	NC	15	--	±	--	--	±	--	--	±	--	--	±	--
		30	25,55	±	1,168	25,54	±	1,002	21,50	±	1,868	25,32	±	1,181
		60	--	±	--	--	±	--	--	±	--	--	±	--
		15	24,84	±	0,982	21,82	±	0,934	20,85	±	1,422	24,20	±	1,004
		30	25,78	±	1,125	23,67	±	0,749	21,75	±	1,466	24,87	±	1,034
		60	23,51	±	1,117	22,59	±	0,673	19,07	±	1,257	22,81	±	0,963
	CAP	15	18,82	±	1,829	18,56	±	1,859	18,68	±	3,195	18,78	±	1,913
		30	--	±	--	--	±	--	--	±	--	--	±	--
		60	19,94	±	1,849	19,63	±	1,182	15,70	±	1,628	19,14	±	1,649
		15	18,92	±	0,836	17,84	±	0,732	14,91	±	0,732	18,25	±	0,809
		30	17,52	±	0,896	15,68	±	0,826	15,08	±	0,827	16,99	±	0,878
		60	17,51	±	1,092	15,07	±	0,764	14,96	±	0,649	16,33	±	0,884
STR	NC	15	--	±	--	--	±	--	--	±	--	--	±	--
		30	82,20	±	1,930	73,14	±	2,601	48,98	±	4,195	78,88	±	2,165
		60	--	±	--	--	±	--	--	±	--	--	±	--
		15	85,36	±	1,667	79,91	±	2,436	46,53	±	3,207	82,17	±	1,864
		30	82,04	±	1,879	78,54	±	2,000	52,60	±	3,306	79,02	±	2,011
		60	81,88	±	1,862	81,96	±	1,810	50,02	±	2,849	79,34	±	1,922
	CAP	15	73,19	±	2,874	68,68	±	4,693	30,33	±	7,141	70,14	±	3,339
		30	--	±	--	--	±	--	--	±	--	--	±	--
		60	71,21	±	2,903	70,73	±	3,037	43,09	±	3,664	66,27	±	3,066
		15	74,54	±	1,502	67,28	±	1,969	38,25	±	1,706	68,87	±	1,592
		30	74,32	±	1,576	68,28	±	2,202	43,44	±	1,912	69,70	±	1,700
		60	64,29	±	1,839	62,21	±	2,040	44,77	±	1,526	58,11	±	1,779

**Tabla S1.7 cont.:** Parámetros de la trayectoria espermática y su variación debida a la centrifugación

Parámetro	MEDIO	TIEMPO (min)	Progresivos		Intermedios		Hiperactivos		Total vigorosos		
LIN	NC	15	--	±	--	--	±	--	--	±	--
		30	0,68	±	0,015	0,57	±	0,025	0,42	±	0,041
		60	--	±	--	--	±	--	--	±	--
		15	0,68	±	0,013	0,58	±	0,023	0,42	±	0,031
		30	0,66	±	0,014	0,58	±	0,018	0,44	±	0,032
		60	0,63	±	0,014	0,59	±	0,016	0,43	±	0,028
	CAP	15	0,65	±	0,023	0,55	±	0,048	0,38	±	0,071
		30	--	±	--	--	±	--	--	±	--
		60	0,61	±	0,023	0,57	±	0,030	0,42	±	0,036
		15	0,65	±	0,011	0,57	±	0,017	0,42	±	0,016
		30	0,65	±	0,012	0,56	±	0,020	0,44	±	0,018
		60	0,59	±	0,014	0,53	±	0,018	0,41	±	0,014
WOB	NC	15	--	±	--	--	±	--	--	±	--
		30	0,77	±	0,818	0,69	±	0,983	0,64	±	2,363
		60	--	±	--	--	±	--	--	±	--
		15	0,75	±	0,671	0,66	±	0,896	0,65	±	1,819
		30	0,74	±	0,779	0,67	±	0,650	0,65	±	1,875
		60	0,70	±	0,776	0,67	±	0,564	0,63	±	1,629
	CAP	15	0,78	±	1,338	0,68	±	1,978	0,76	±	3,994
		30	--	±	--	--	±	--	--	±	--
		60	0,74	±	1,353	0,69	±	1,198	0,67	±	2,071
		15	0,77	±	0,529	0,72	±	0,613	0,73	±	1,013
		30	0,78	±	0,583	0,70	±	0,724	0,71	±	1,124
		60	0,76	±	0,750	0,71	±	0,663	0,64	±	0,917

Promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación de los parámetros de la trayectoria tras 60 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), en suspensiones espermáticas centrifugadas o no.

**Tabla S1.8:** Componentes principales de la velocidad espermática y su variación debida a la centrifugación

Parámetro	MEDIO	TIEMPO (min)	Progresivos	Intermedios	Hiperactivos	Total vigorosos
OSV 1	NC	15	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	0,11 ± 0,133	0,62 ± 0,090	0,19 ± 0,195	0,19 ± 0,130
		60	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		15	0,50 ± 0,118	0,60 ± 0,083	-0,23 ± 0,146	0,46 ± 0,115
		30	0,19 ± 0,131	0,76 ± 0,064	-0,04 ± 0,151	0,35 ± 0,112
		60	0,26 ± 0,129	0,74 ± 0,057	-0,12 ± 0,128	0,41 ± 0,102
	CAP	15	-0,42 ± 0,189	0,68 ± 0,174	-0,52 ± 0,338	-0,30 ± 0,196
		30	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	-0,44 ± 0,191	0,40 ± 0,108	-0,29 ± 0,169	-0,21 ± 0,167
		15	-0,26 ± 0,110	0,44 ± 0,062	-0,14 ± 0,067	-0,15 ± 0,098
		30	-0,33 ± 0,114	0,39 ± 0,071	-0,22 ± 0,079	-0,22 ± 0,104
		60	-0,80 ± 0,129	0,19 ± 0,066	-0,08 ± 0,057	-0,37 ± 0,093
OSV 2	NC	15	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	0,61 ± 0,064	-0,46 ± 0,055	-1,89 ± 0,189	0,30 ± 0,070
		60	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		15	0,43 ± 0,051	-0,45 ± 0,051	-1,72 ± 0,144	0,18 ± 0,057
		30	0,34 ± 0,061	-0,46 ± 0,040	-1,55 ± 0,149	-0,03 ± 0,060
		60	0,08 ± 0,061	-0,41 ± 0,036	-1,74 ± 0,129	-0,25 ± 0,057
	CAP	15	0,59 ± 0,111	-0,69 ± 0,104	-2,10 ± 0,321	0,28 ± 0,123
		30	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	0,30 ± 0,113	-0,44 ± 0,065	-1,64 ± 0,165	-0,21 ± 0,110
		15	0,54 ± 0,035	-0,47 ± 0,039	-1,69 ± 0,078	0,11 ± 0,041
		30	0,66 ± 0,041	-0,52 ± 0,044	-1,56 ± 0,087	0,21 ± 0,048
		60	0,32 ± 0,058	-0,63 ± 0,041	-1,77 ± 0,070	-0,54 ± 0,058

Promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación de los componentes principales de la velocidad (OSV1 y 2), tras 60 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), en suspensiones espermáticas centrifugadas o no.

**Tabla S1.9:** Componentes principales de la trayectoria espermática y su variación debida a la centrifugación

Parámetro	MEDIO	TIEMPO (min)	Progresivos	Intermedios	Hiperactivos	Total vigorosos	
OTS 1	15	No centrifugados	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	30		0,76 ± 0,085	-0,08 ± 0,082	-1,27 ± 0,138	-0,01 ± 0,088	
	60		-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	15	Centrifugados	0,70 ± 0,072	-0,18 ± 0,077	-1,26 ± 0,104	0,46 ± 0,074	
	30		0,57 ± 0,082	-0,09 ± 0,061	-1,09 ± 0,107	0,36 ± 0,077	
	60		0,25 ± 0,082	-0,07 ± 0,055	-1,36 ± 0,091	0,00 ± 0,072	
	CAP	15	No centrifugados	0,29 ± 0,136	-0,55 ± 0,154	-1,39 ± 0,240	0,10 ± 0,144
		30		-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60		0,09 ± 0,137	-0,39 ± 0,097	-1,45 ± 0,120	-0,30 ± 0,124
		15	Centrifugados	0,34 ± 0,060	-0,54 ± 0,059	-1,49 ± 0,048	-0,01 ± 0,058
		30		0,40 ± 0,064	-0,63 ± 0,067	-1,51 ± 0,056	0,02 ± 0,064
		60		-0,07 ± 0,080	-0,86 ± 0,062	-1,65 ± 0,041	-0,73 ± 0,064
OTS 2	15	No centrifugados	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	30		-0,55 ± 0,110	0,30 ± 0,128	-0,67 ± 0,231	0,00 ± 0,120	
	60		-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	15	Centrifugados	-0,51 ± 0,096	0,06 ± 0,118	-0,51 ± 0,176	0,50 ± 0,104	
	30		-0,49 ± 0,108	0,46 ± 0,090	0,00 ± 0,181	0,33 ± 0,107	
	60		-0,66 ± 0,106	0,38 ± 0,079	0,41 ± 0,156	0,77 ± 0,100	
	CAP	15	No centrifugados	-0,67 ± 0,161	0,63 ± 0,248	-1,01 ± 0,395	-0,54 ± 0,185
		30		-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60		-0,39 ± 0,163	0,41 ± 0,153	-0,39 ± 0,201	-0,20 ± 0,167
		15	Centrifugados	-0,51 ± 0,088	0,06 ± 0,086	-0,51 ± 0,091	-0,43 ± 0,088
		30		-0,49 ± 0,091	0,46 ± 0,099	0,00 ± 0,103	-0,31 ± 0,094
		60		-0,66 ± 0,105	0,38 ± 0,091	0,41 ± 0,081	-0,11 ± 0,095

Promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación de los componentes principales de la trayectoria (OTS1 y 2), tras 60 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), en suspensiones espermáticas centrifugadas o no.



**Tabla S2.1:** Porcentaje de espermatozoides vivos según la presencia de calcio o magnesio

MEDIO	Calcio	Magnesio	TIEMPO (min)	Porcentaje
<b>CAP</b>	+	+	0	56,2 <sup>c</sup> ± 1,686
	+	+	30	46,03 <sup>ab</sup> ± 2,532
	+	+	60	42,5 <sup>a</sup> ± 2,125
	-	+	0	68,23 <sup>d</sup> ± 2,047
	-	+	30	71,05 <sup>e</sup> ± 1,421
	-	+	60	61,3 <sup>d</sup> ± 1,226
	+	-	0	64,02 <sup>d</sup> ± 3,201
	+	-	30	50,1 <sup>b</sup> ± 2,505
	+	-	60	47,2 <sup>b</sup> ± 1,652

Promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación en el porcentaje de espermatozoides vivos tras 60 min de incubación en condiciones capacitantes (CAP), en suspensiones espermáticas en presencia o ausencia de calcio o magnesio. Los niveles de significación se indican mediante letras.

Tabla S2.2 Porcentaje de espermatozoides vigorosos

MEDIO	Tiempo (Min)	Calcio	Magnesio	EGTA	Porcentaje	
NC	15	+	+	-	63,22 ± 1,391	
	30	+	+	-	65,48 ± 1,440	
	45	+	+	-	69,73 ± 1,534	
	60	+	+	-	70,02 ± 1,540	
	60	-	+	-	65,67 ± 1,445	
	30	+	-	-	72,78 ± 1,601	
	60	+	-	-	54,02 ± 1,188	
	60	+	+	+	64,38 ± 1,416	
	60	+	-	+	63,17 ± 1,390	
	15	-	-	-	66,53 ± 1,464	
	30	-	-	-	8,00 ± 0,176	
	60	-	-	+	64,64 ± 1,422	
	30	-/+	-	Calcio añadido tras 10 min de incubación en ausencia de ambos cationes	10,00 ± 0,220	
	45	-/+	-		18,00 ± 0,396	
	60	-/+	-		20,00 ± 0,440	
	30	-	-/+	Magnesio añadido tras 10 min de incubación en ausencia de ambos cationes	15,00 ± 0,330	
	45	-	-/+		27,00 ± 0,594	
	60	-	-/+		32,00 ± 0,704	
	30	-/+	-/+	Calcio y magnesio añadidos tras 10 min de incubación en ausencia de ambos cationes	22,00 ± 0,484	
	45	-/+	-/+		35,00 ± 0,770	
	60	-/+	-/+		40,00 ± 0,880	
	CAP	10	+	+	-	72,77 ± 1,601
		15	+	+	-	69,69 ± 1,533
		30	+	+	-	71,48 ± 1,572
		45	+	+	-	73,19 ± 1,610
		60	+	+	-	67,23 ± 1,479
		10	-	+	-	70,05 ± 1,541
15		-	+	-	71,76 ± 1,579	
30		-	+	-	69,48 ± 1,529	
45		-	+	-	71,18 ± 1,566	
60		-	+	-	71,98 ± 1,584	
10		+	-	-	71,31 ± 1,569	
15		+	-	-	68,30 ± 1,502	
30		+	-	-	68,06 ± 1,497	
45		+	-	-	68,42 ± 1,505	
60		+	-	-	69,22 ± 1,523	
10		+	+	+	69,14 ± 1,521	
15		+	+	+	73,89 ± 1,626	
60		+	+	+	72,11 ± 1,586	
60		-	+	+	73,39 ± 1,615	
60		+	-	+	66,17 ± 1,456	
60		+	-	+	63,17 ± 1,390	
15		-	-	-	70,84 ± 1,559	
30		-	-	-	4,07 ± 0,090	
45		-	-	-	0,00 ± 0,000	
60		-	-	+	64,64 ± 1,422	
30		-/+	-	Calcio añadido tras 10 min de incubación en ausencia de ambos cationes	11,00 ± 0,242	
45		-/+	-		22,00 ± 0,484	
60		-/+	-		25,00 ± 0,550	
30		-	-/+	Magnesio añadido tras 10 min de incubación en ausencia de ambos cationes	17,00 ± 0,374	
45		-	-/+		32,00 ± 0,704	
60	-	-/+		36,00 ± 0,792		
30	-/+	-/+	Calcio y magnesio añadidos tras 10 min de incubación en ausencia de ambos cationes	20,00 ± 0,440		
45	-/+	-/+		37,00 ± 0,814		
60	-/+	-/+		43,00 ± 0,946		

Valor promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación en el porcentaje de espermatozoides vigorosos, tras 60 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), en presencia o ausencia de calcio, magnesio o zinc.

**Tabla S2.3:** Porcentaje de cada clase espermática (vigorosos)

<b>% Espermatozoides progresivos</b>																	
MEDIO	TIEMPO (min)	Control	Ausencia calcio			Ausencia magnesio			Ausencia calcio presencia EGTA			Ausencia magnesio, presencia EGTA			Presencia EGTA		
NC	15	90,50 ± 7,111	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	30	79,12 ± 6,119	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	60	92,26 ± 4,334	88,11 ± 4,071	90,14 ± 4,083	86,46 ± 4,000	79,87 ± 4,072	84,75 ± 4,843										
CAP	15	88,15 ± 4,891	91,24 ± 5,903	87,11 ± 4,891	-- ± --	-- ± --	88,11 ± 9,566										
	30	86,46 ± 4,891	93,20 ± 6,966	85,87 ± 4,891	-- ± --	-- ± --	-- ± --										
	60	76,36 ± 4,430	91,49 ± 4,048	84,99 ± 4,048	97,02 ± 4,048	86,51 ± 4,048	77,87 ± 5,275										
<b>% Espermatozoides intermedios</b>																	
NC	15	7,44 ± 4,769	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	30	12,41 ± 4,093	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	60	3,90 ± 2,878	6,23 ± 2,701	7,00 ± 2,709	6,36 ± 2,656	14,00 ± 2,702	5,84 ± 3,226										
CAP	15	4,10 ± 3,273	5,58 ± 3,959	7,84 ± 3,273	-- ± --	-- ± --	4,90 ± 6,429										
	30	3,94 ± 3,273	5,48 ± 4,677	9,03 ± 3,273	-- ± --	-- ± --	-- ± --										
	60	6,97 ± 2,945	5,94 ± 2,707	7,70 ± 2,707	1,99 ± 2,707	5,85 ± 2,707	8,47 ± 3,535										
<b>% Espermatozoides hiperactivos</b>																	
NC	15	2,07 ± 4,030	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	30	8,47 ± 3,449	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	60	3,85 ± 2,402	5,65 ± 2,253	2,85 ± 2,259	7,18 ± 2,217	6,13 ± 2,253	9,41 ± 2,703										
CAP	15	7,75 ± 2,759	3,19 ± 3,345	5,05 ± 2,759	-- ± --	-- ± --	6,99 ± 5,447										
	30	9,60 ± 2,759	1,33 ± 3,959	5,10 ± 2,759	-- ± --	-- ± --	-- ± --										
	60	16,67 ± 2,463	2,57 ± 2,279	7,31 ± 2,279	0,99 ± 2,279	7,64 ± 2,279	13,67 ± 2,984										

Promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación en el porcentaje de cada clase de la categoría de vigorosos (progresivos, intermedios o hiperactivos), tras 60 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), en presencia o ausencia de calcio, magnesio o zinc.

**Tabla S2.4:** Intensidad relativa de la señal

pPKA	Control	Medio sin calcio	Medio sin calcio, con EGTA	Medio sin magnesio	Medio sin magnesio con EGTA	Medio sin cationes, con EGTA
<b>NC</b>	26,74 <sup>c</sup> ± 0,448	13,96 <sup>a</sup> ± 0,317	53,60 <sup>e</sup> ± 0,661	36,72 <sup>d</sup> ± 0,530	N/A	19,75 <sup>b</sup> ± 0,377
<b>CAP</b>	102,62 <sup>d</sup> ± 1,021	51,25 <sup>b</sup> ± 0,644	64,71 <sup>c</sup> ± 0,741	123,96 <sup>e</sup> ± 1,237	123,39 <sup>e</sup> ± 1,206	41,35 <sup>a</sup> ± 0,569
<b>pY</b>						
<b>NC</b>	40,97 <sup>c</sup> ± 0,566	39,53 <sup>c</sup> ± 0,553	77,37 ± 0,878	46,56 <sup>d</sup> ± 0,611	31,94 <sup>b</sup> ± 0,497	19,75 <sup>a</sup> ± 0,383
<b>CAP</b>	97,33 <sup>d</sup> ± 0,987	58,60 <sup>b</sup> ± 0,703	126,95 <sup>f</sup> ± 1,261	116,43 <sup>e</sup> ± 1,149	88,39 <sup>c</sup> ± 0,918	49,27 <sup>a</sup> ± 0,635

Promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la intensidad relativa de la señal de los *Blots* realizados para determinar la fosforilación de proteínas diana de la proteína quinasa A (pPKA) y de las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina (pY), a los 60 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), en presencia o ausencia de calcio, magnesio o EGTA. Los niveles de significación, de cada tipo de proteínas, se indican mediante letras.

**Tabla S2.5:** Parámetros de la velocidad espermática

Medio	TIEMPO (min)	MUESTRA	Progresivos	Intermedios	Hiperactivos	Total vigorosos
NC	15	Control	92,20 ± 2,275	113,54 ± 4,771	118,90 ± 9,158	95,77 ± 2,822
	30		82,46 ± 2,321	100,22 ± 3,662	94,02 ± 4,167	87,04 ± 2,797
	60		75,66 ± 1,479	97,58 ± 3,603	85,53 ± 4,127	77,22 ± 1,706
	60	Sin calcio	85,50 ± 1,726	97,79 ± 3,026	90,81 ± 3,181	87,49 ± 2,034
	60	Sin calcio + EGTA	75,85 ± 1,955	99,63 ± 3,769	105,92 ± 4,523	81,30 ± 2,395
	60	Sin Magnesio	73,23 ± 3,327	97,27 ± 9,115	84,91 ± 9,158	75,85 ± 4,182
	60	Sin Magnesio + EGTA	78,89 ± 2,265	102,99 ± 2,887	101,32 ± 5,568	86,17 ± 2,633
	60	Con EGTA	70,29 ± 2,060	83,67 ± 5,738	91,65 ± 6,425	72,28 ± 2,525
	VAP	15	Control	71,93 ± 1,123	95,37 ± 4,135	99,98 ± 3,372
30		58,10 ± 1,922		98,40 ± 5,911	115,20 ± 4,118	67,48 ± 2,418
60		68,22 ± 1,622		112,69 ± 3,515	108,28 ± 2,692	79,25 ± 1,971
15		Sin calcio	82,02 ± 0,923	92,25 ± 2,800	94,02 ± 3,795	83,02 ± 1,127
30			82,42 ± 1,654	105,60 ± 6,176	99,10 ± 11,880	83,69 ± 1,990
60			79,18 ± 1,205	86,13 ± 3,294	83,15 ± 5,332	79,78 ± 1,463
60		Sin calcio + EGTA	91,10 ± 1,269	103,05 ± 5,188	98,78 ± 7,866	91,57 ± 1,482
15		Sin magnesio	81,15 ± 1,061	109,76 ± 2,827	100,69 ± 3,476	84,00 ± 1,293
30			73,63 ± 1,493	105,37 ± 3,602	101,45 ± 4,797	78,05 ± 1,864
60	77,29 ± 1,324		103,52 ± 3,630	97,53 ± 3,824	80,44 ± 1,649	
60	Sin Magnesio + EGTA	82,79 ± 1,326	114,76 ± 2,839	107,76 ± 2,607	89,30 ± 1,647	
15	Con EGTA	81,67 ± 2,145	106,66 ± 7,651	101,24 ± 6,476	84,26 ± 2,718	
60		71,98 ± 1,514	101,01 ± 3,518	109,03 ± 2,752	81,00 ± 1,908	

**Tabla S2.5 cont.:** Parámetros de la velocidad espermática

Medio	TIEMPO (min)	MUESTRA	Progresivos	Intermedios	Hiperactivos	Total vigorosos
NC	15	Control	71,80 ± 2,198	74,38 ± 3,921	53,82 ± 4,518	71,50 ± 2,492
	30		62,42 ± 2,242	69,82 ± 2,954	50,45 ± 2,104	62,09 ± 2,346
	60		57,89 ± 1,432	66,75 ± 2,909	42,38 ± 2,221	57,64 ± 1,543
	60	Sin calcio	64,33 ± 1,670	66,32 ± 2,418	45,15 ± 1,664	62,49 ± 1,755
	60	Sin calcio + EGTA	58,01 ± 1,890	64,13 ± 3,048	51,69 ± 2,363	58,19 ± 2,069
	60	Sin Magnesio	53,12 ± 3,215	73,92 ± 7,449	35,35 ± 4,518	53,34 ± 3,622
	60	Sin Magnesio + EGTA	58,40 ± 2,189	72,58 ± 2,338	55,03 ± 2,816	61,59 ± 2,266
	60	EGTA	51,33 ± 1,991	57,54 ± 4,632	46,39 ± 3,398	51,46 ± 2,233
VSL	15	Control	51,48 ± 1,084	53,88 ± 3,291	43,84 ± 1,775	51,07 ± 1,210
	30		36,66 ± 1,856	58,70 ± 4,814	46,09 ± 2,093	39,07 ± 2,050
	60		39,15 ± 1,568	60,00 ± 2,735	44,27 ± 1,578	41,73 ± 1,661
	15	Sin calcio	62,35 ± 0,891	60,43 ± 2,212	45,32 ± 1,921	61,68 ± 1,003
	30		63,49 ± 1,597	71,75 ± 5,029	41,95 ± 5,880	63,60 ± 1,809
	60		60,47 ± 1,164	59,64 ± 2,574	40,35 ± 2,703	59,88 ± 1,305
60	Sin calcio + EGTA	74,03 ± 1,226	70,52 ± 4,181	45,48 ± 3,922	73,53 ± 1,355	
CAP	15	Sin magnesio	58,63 ± 1,025	65,12 ± 2,174	41,82 ± 1,813	58,29 ± 1,139
	30		48,09 ± 1,442	59,75 ± 2,844	48,81 ± 2,435	49,21 ± 1,625
	60		48,89 ± 1,279	58,79 ± 2,846	42,14 ± 1,997	49,12 ± 1,434
	60	Sin Magnesio + EGTA	51,70 ± 1,281	63,86 ± 2,233	42,51 ± 1,350	51,70 ± 1,385
	15	Con EGTA	60,28 ± 2,072	69,44 ± 6,288	50,25 ± 3,195	60,02 ± 2,357
	60		46,97 ± 1,463	58,03 ± 2,769	52,07 ± 1,445	48,84 ± 1,577

**Tabla S2.5 cont.:** Parámetros de la velocidad espermática

Medio	TIEMPO (min)	MUESTRA	Progresivos	Intermedios	Hiperactivos	Total vigorosos
NC	15		202,84 ± 4,584	280,39 ± 7,296	284,84 ± 16,185	215,30 ± 5,321
	30	Control	190,65 ± 4,682	270,19 ± 5,815	264,67 ± 7,571	214,16 ± 5,262
	60		177,32 ± 3,016	266,80 ± 5,702	232,52 ± 8,079	184,36 ± 3,380
	60	Sin calcio	197,59 ± 3,501	262,51 ± 4,881	245,20 ± 6,045	210,23 ± 3,935
	60	Sin calcio + EGTA	175,93 ± 3,952	262,54 ± 5,994	267,37 ± 8,569	194,22 ± 4,598
	60	Sin magnesio	184,63 ± 6,713	267,83 ± 14,132	212,95 ± 16,185	192,83 ± 7,955
	60	Sin magnesio + EGTA	191,45 ± 4,578	272,90 ± 4,532	273,10 ± 10,142	216,44 ± 4,935
	60	Con EGTA	169,45 ± 4,167	247,62 ± 9,157	248,45 ± 12,381	178,60 ± 4,920
VCL	15		154,45 ± 2,262	234,67 ± 6,621	240,56 ± 6,404	162,95 ± 2,690
	30	Control	123,52 ± 3,870	240,60 ± 9,176	255,92 ± 7,524	146,57 ± 4,622
	60		144,84 ± 3,291	240,92 ± 5,980	250,90 ± 5,796	172,36 ± 3,974
	15		182,68 ± 1,859	243,81 ± 4,462	239,05 ± 6,901	188,11 ± 2,176
	30	Sin calcio	175,50 ± 3,329	274,22 ± 9,557	221,57 ± 21,074	180,62 ± 3,838
	60		188,50 ± 2,428	246,62 ± 5,399	226,77 ± 9,714	193,64 ± 2,832
	60	Sin calcio + EGTA	183,02 ± 2,559	261,65 ± 8,177	236,36 ± 14,068	186,21 ± 2,891
	15		169,77 ± 2,139	250,71 ± 4,676	231,09 ± 6,537	178,11 ± 2,516
	30	Sin magnesio	154,95 ± 3,008	242,61 ± 5,816	247,12 ± 8,752	167,98 ± 3,573
	60		160,05 ± 2,667	238,12 ± 6,003	230,74 ± 7,200	170,12 ± 3,199
	60	Sin magnesio + EGTA	165,03 ± 2,672	248,57 ± 4,583	233,24 ± 4,861	182,42 ± 3,153
	15		174,81 ± 4,318	258,70 ± 11,700	256,69 ± 11,444	184,64 ± 5,178
60	Con EGTA	154,90 ± 3,050	239,26 ± 5,703	277,99 ± 5,209	183,75 ± 3,662	

Promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación de los parámetros de la velocidad, tras 60 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), en presencia o ausencia de calcio, magnesio o EGTA.

**Tabla S2.6:** Parámetros de la trayectoria espermática

Medio	TIEMPO (min)	MUESTRA	Progresivos	Intermedios	Hiperactivos	Total vigorosos	
NC	15	Control	6,70 ± 0,197	9,00 ± 0,411	8,60 ± 1,051	7,05 ± 0,253	
	30		7,05 ± 0,200	8,87 ± 0,325	7,68 ± 0,478	7,45 ± 0,259	
	60		6,60 ± 0,125	9,28 ± 0,319	7,88 ± 0,471	6,79 ± 0,151	
	60	Sin calcio	7,36 ± 0,148	9,01 ± 0,272	8,40 ± 0,364	7,66 ± 0,185	
	60	Sin calcio + EGTA	7,09 ± 0,168	9,68 ± 0,334	9,43 ± 0,518	7,60 ± 0,218	
	60	Sin magnesio	7,46 ± 0,287	9,67 ± 0,793	7,87 ± 1,051	7,65 ± 0,381	
	60	Sin magnesio + EGTA	7,76 ± 0,195	8,85 ± 0,254	9,31 ± 0,638	8,13 ± 0,238	
	60	Con EGTA	6,67 ± 0,177	8,69 ± 0,511	8,40 ± 0,735	6,89 ± 0,228	
	ALH	15	Control	6,48 ± 0,097	10,95 ± 0,370	12,10 ± 0,385	7,01 ± 0,126
		30		5,72 ± 0,166	12,27 ± 0,515	13,24 ± 0,472	7,03 ± 0,224
60		6,88 ± 0,139		11,25 ± 0,329	12,90 ± 0,305	8,36 ± 0,185	
15		Sin calcio	7,45 ± 0,080	9,78 ± 0,250	9,06 ± 0,435	7,64 ± 0,101	
30			6,69 ± 0,143	9,34 ± 0,537	7,23 ± 1,363	6,82 ± 0,177	
60			7,38 ± 0,104	9,57 ± 0,300	8,56 ± 0,611	7,57 ± 0,132	
60		Sin calcio + EGTA	6,57 ± 0,110	9,53 ± 0,458	7,88 ± 0,902	6,68 ± 0,131	
CAP		15	Sin magnesio	7,14 ± 0,092	10,92 ± 0,260	10,42 ± 0,397	7,55 ± 0,117
		30		7,17 ± 0,129	11,39 ± 0,324	11,42 ± 0,549	7,79 ± 0,170
		60		7,40 ± 0,115	10,67 ± 0,333	11,30 ± 0,437	7,88 ± 0,151
	60	Sin magnesio + EGTA	7,43 ± 0,115	11,81 ± 0,256	11,66 ± 0,298	8,43 ± 0,153	
	15	Con EGTA	7,17 ± 0,186	9,11 ± 0,658	11,91 ± 0,743	7,59 ± 0,248	
	60		6,89 ± 0,131	11,53 ± 0,318	14,28 ± 0,314	8,59 ± 0,180	



**Tabla S2.6 cont.:** Parámetros de la trayectoria espermática

Medio	TIEMPO (min)	MUESTRA	Progresivos	Intermedios	Hiperactivos	Total vigorosos	
NC	15	Control	24,79 ± 0,513	23,71 ± 1,023	19,58 ± 2,027	24,47 ± 0,628	
	30		22,21 ± 0,524	21,16 ± 0,819	22,94 ± 0,906	22,13 ± 0,625	
	60		22,27 ± 0,337	20,57 ± 0,803	19,71 ± 0,841	22,07 ± 0,383	
	60	Sin calcio	22,12 ± 0,391	20,63 ± 0,688	20,84 ± 0,676	21,81 ± 0,456	
	60	Sin calcio + EGTA	20,54 ± 0,442	17,57 ± 0,845	17,87 ± 0,966	19,95 ± 0,536	
	60	Sin magnesio	19,14 ± 0,751	20,65 ± 1,985	16,42 ± 2,027	19,05 ± 0,936	
	60	Sin magnesio + EGTA	18,74 ± 0,512	21,28 ± 0,637	20,04 ± 1,211	19,44 ± 0,588	
BCF	60	Con EGTA	20,87 ± 0,466	19,30 ± 1,291	17,78 ± 1,366	20,61 ± 0,566	
	15	Control	17,93 ± 0,253	13,23 ± 0,932	12,06 ± 0,668	17,38 ± 0,305	
	30		17,28 ± 0,433	13,29 ± 1,288	11,36 ± 0,872	16,31 ± 0,536	
	60		14,92 ± 0,368	12,96 ± 0,850	11,04 ± 0,470	14,03 ± 0,425	
	15	Sin calcio	19,59 ± 0,208	15,82 ± 0,627	16,39 ± 0,801	19,27 ± 0,252	
	30		20,44 ± 0,373	18,81 ± 1,341	15,03 ± 2,616	20,30 ± 0,445	
	60		20,23 ± 0,272	16,62 ± 0,762	17,84 ± 1,133	19,91 ± 0,329	
	60	Sin calcio + EGTA	21,06 ± 0,286	15,04 ± 1,150	18,62 ± 1,713	20,83 ± 0,333	
	CAP	15	Sin magnesio	17,55 ± 0,239	14,78 ± 0,660	15,12 ± 0,699	17,25 ± 0,289
		30		16,58 ± 0,337	14,48 ± 0,819	14,27 ± 1,013	16,26 ± 0,417
		60		15,87 ± 0,299	14,04 ± 0,848	13,50 ± 0,777	15,59 ± 0,368
		60	Sin magnesio + EGTA	16,50 ± 0,299	12,74 ± 0,646	12,91 ± 0,523	15,65 ± 0,363
		15	Con EGTA	17,11 ± 0,483	16,41 ± 1,640	12,52 ± 1,433	16,75 ± 0,606
		60		16,85 ± 0,341	12,99 ± 0,804	11,62 ± 0,538	15,60 ± 0,417

**Tabla S2.6 cont.:** Parámetros de la trayectoria espermática

Medio	TIEMPO (min)	MUESTRA	Progresivos	Intermedios	Hiperactivos	Total vigorosos
NC	15	Control	76,07 ± 1,240	67,80 ± 2,405	45,92 ± 3,647	74,00 ± 1,467
	30		73,68 ± 1,264	69,71 ± 1,867	54,39 ± 1,685	70,42 ± 1,424
	60		74,77 ± 0,804	68,82 ± 1,835	49,85 ± 1,746	73,35 ± 0,899
	60	Sin calcio	73,87 ± 0,939	67,65 ± 1,551	49,82 ± 1,316	70,55 ± 1,051
	60	Sin calcio + EGTA	75,00 ± 1,065	64,92 ± 1,921	50,03 ± 1,871	71,62 ± 1,237
	60	Sin magnesio	70,93 ± 1,813	72,87 ± 4,612	42,45 ± 3,647	68,98 ± 2,153
	60	Sin magnesio + EGTA	72,08 ± 1,233	70,21 ± 1,467	54,66 ± 2,254	70,48 ± 1,357
	60	Con EGTA	71,85 ± 1,121	69,21 ± 2,927	49,96 ± 2,675	70,51 ± 1,318
STR	15	Control	69,40 ± 0,612	56,81 ± 2,118	44,29 ± 1,411	67,32 ± 0,718
	30		61,75 ± 1,047	59,42 ± 2,995	40,79 ± 1,677	59,00 ± 1,234
	60		55,91 ± 0,882	53,31 ± 1,829	41,67 ± 1,216	53,01 ± 1,019
	15	Sin calcio	74,71 ± 0,503	65,51 ± 1,434	49,08 ± 1,542	73,34 ± 0,591
	30		74,25 ± 0,901	67,14 ± 3,127	44,42 ± 4,743	73,55 ± 1,052
	60		75,06 ± 0,657	68,73 ± 1,702	48,41 ± 2,168	73,91 ± 0,771
	60	Sin calcio + EGTA	79,31 ± 0,692	68,46 ± 2,642	46,82 ± 3,158	78,53 ± 0,786
	15	Sin magnesio	70,96 ± 0,578	59,29 ± 1,468	42,14 ± 1,445	68,82 ± 0,679
30	64,66 ± 0,813		56,41 ± 1,851	48,39 ± 1,952	63,03 ± 0,970	
60	62,22 ± 0,721		56,93 ± 1,878	43,72 ± 1,590	60,63 ± 0,858	
60	Sin magnesio + EGTA	62,14 ± 0,722	55,87 ± 1,460	39,57 ± 1,078	58,53 ± 0,843	
15	Con EGTA	70,34 ± 1,169	63,12 ± 3,857	50,71 ± 2,579	68,61 ± 1,399	
60		63,54 ± 0,825	57,19 ± 1,811	48,03 ± 1,150	60,29 ± 0,970	

**Tabla S2.6 cont.: Parámetros de la trayectoria espermática**

Medio	TIEMPO (min)	MUESTRA	Progresivos	Intermedios	Hiperactivos	Total vigorosos
NC	15	Control	34,61 ± 0,936	26,39 ± 0,865	18,83 ± 0,974	33,05 ± 0,929
	30		32,85 ± 0,949	25,60 ± 0,649	19,00 ± 0,446	29,76 ± 0,830
	60		32,59 ± 0,580	24,58 ± 0,639	18,07 ± 0,449	31,53 ± 0,577
	60	Sin calcio	32,17 ± 0,691	24,83 ± 0,530	18,26 ± 0,343	29,82 ± 0,635
	60	Sin calcio + EGTA	33,18 ± 0,793	24,17 ± 0,670	19,14 ± 0,487	30,88 ± 0,752
	60	Sin magnesio	28,28 ± 1,363	26,39 ± 1,641	16,60 ± 0,974	27,28 ± 1,355
	60	Sin magnesio + EGTA	29,94 ± 0,920	26,23 ± 0,514	19,84 ± 0,596	28,38 ± 0,801
	60	Con EGTA	30,60 ± 0,834	23,14 ± 1,018	18,27 ± 0,694	29,47 ± 0,838
LIN	15	Control	33,18 ± 0,461	22,76 ± 0,720	18,10 ± 0,366	31,82 ± 0,464
	30		30,37 ± 0,792	24,16 ± 1,060	17,99 ± 0,442	28,48 ± 0,763
	60		26,93 ± 0,648	24,50 ± 0,595	17,56 ± 0,301	24,97 ± 0,578
	15	Sin calcio	34,31 ± 0,380	24,46 ± 0,482	18,83 ± 0,407	33,22 ± 0,387
	30		35,27 ± 0,683	25,75 ± 1,107	18,69 ± 1,265	34,63 ± 0,710
	60		32,31 ± 0,495	23,80 ± 0,560	17,60 ± 0,572	31,31 ± 0,502
CAP	60	Sin calcio + EGTA	41,10 ± 0,521	26,65 ± 0,918	19,03 ± 0,840	40,35 ± 0,538
	15	Sin magnesio	34,78 ± 0,435	25,63 ± 0,470	17,93 ± 0,377	33,38 ± 0,434
	30		31,42 ± 0,614	24,29 ± 0,620	19,62 ± 0,515	30,13 ± 0,609
	60		30,43 ± 0,544	24,41 ± 0,620	18,20 ± 0,414	29,20 ± 0,540
	60	Sin magnesio + EGTA	31,72 ± 0,545	25,35 ± 0,486	18,09 ± 0,282	29,28 ± 0,504
	15	Con EGTA	33,16 ± 0,887	25,50 ± 1,387	19,41 ± 0,689	31,83 ± 0,898
60	30,20 ± 0,623		23,92 ± 0,603	18,68 ± 0,299	27,64 ± 0,566	

**Tabla S2.6 cont.:** Parámetros de la trayectoria espermática

Medio	TIEMPO (min)	MUESTRA	Progresivos	Intermedios	Hiperactivos	Total vigorosos
NC	15	Control	45,38 ± 0,899	40,71 ± 1,417	41,62 ± 3,060	44,67 ± 1,038
	30		44,28 ± 0,914	37,09 ± 1,111	35,69 ± 1,408	41,90 ± 1,014
	60		43,44 ± 0,568	36,49 ± 1,091	36,99 ± 1,440	42,80 ± 0,633
	60	Sin calcio	43,66 ± 0,671	36,93 ± 0,927	37,02 ± 1,091	42,16 ± 0,746
	60	Sin calcio + EGTA	44,22 ± 0,766	38,18 ± 1,144	40,09 ± 1,551	43,14 ± 0,879
	60	Sin magnesio	39,54 ± 1,311	36,08 ± 2,727	39,82 ± 3,060	39,30 ± 1,544
	60	Sin magnesio + EGTA	41,44 ± 0,888	37,79 ± 0,871	36,91 ± 1,882	40,26 ± 0,949
	60	Con EGTA	42,39 ± 0,806	33,80 ± 1,744	37,37 ± 2,212	41,58 ± 0,940
	WOB	15	Control	47,59 ± 0,443	40,69 ± 1,264	41,77 ± 1,170
30		48,97 ± 0,760		40,92 ± 1,771	45,45 ± 1,400	48,08 ± 0,896
60		48,09 ± 0,629		46,49 ± 1,108	43,30 ± 0,987	47,06 ± 0,734
15		Sin calcio	45,71 ± 0,365	37,73 ± 0,855	39,27 ± 1,288	45,04 ± 0,424
30			47,27 ± 0,655	38,49 ± 1,848	44,37 ± 3,977	46,83 ± 0,751
60			42,91 ± 0,476	34,81 ± 1,022	36,70 ± 1,810	42,17 ± 0,550
60		Sin calcio + EGTA	51,81 ± 0,501	39,30 ± 1,569	42,66 ± 2,645	51,29 ± 0,564
15		Sin magnesio	48,81 ± 0,418	43,89 ± 0,884	43,80 ± 1,200	48,25 ± 0,486
30			48,47 ± 0,590	43,48 ± 1,107	41,13 ± 1,630	47,62 ± 0,693
60	48,59 ± 0,522		43,51 ± 1,130	42,46 ± 1,320	47,84 ± 0,617	
60	Sin magnesio + EGTA	50,78 ± 0,523	46,15 ± 0,873	46,46 ± 0,897	49,75 ± 0,608	
15	Con EGTA	47,25 ± 0,850	41,69 ± 2,272	39,61 ± 2,164	46,45 ± 1,011	
60		47,38 ± 0,599	42,25 ± 1,084	39,68 ± 0,954	45,59 ± 0,704	
CAP	15	Con EGTA	47,25 ± 0,850	41,69 ± 2,272	39,61 ± 2,164	46,45 ± 1,011
	60		47,38 ± 0,599	42,25 ± 1,084	39,68 ± 0,954	45,59 ± 0,704

Promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación de los parámetros de la trayectoria, tras 60 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), en presencia o ausencia de calcio, magnesio o EGTA.

Tabla S2.7: Componentes principales de la velocidad espermática

Medio	TIEMPO (min)	MUESTRA	Progresivos	Intermedios	Hiperactivos	Total vigorosos
NC	15	Control	0,43 ± 0,091	1,13 ± 0,111	0,95 ± 0,202	0,54 ± 0,097
	30		0,12 ± 0,093	0,91 ± 0,086	0,56 ± 0,094	0,31 ± 0,092
	60		-0,05 ± 0,059	0,80 ± 0,085	0,21 ± 0,100	0,00 ± 0,062
	60	Sin calcio	0,27 ± 0,069	0,78 ± 0,072	0,35 ± 0,075	0,34 ± 0,070
	60	Sin calcio con EGTA	-0,07 ± 0,078	0,80 ± 0,089	0,71 ± 0,106	0,10 ± 0,082
	60	Sin magnesio	-0,09 ± 0,133	0,82 ± 0,213	-0,01 ± 0,202	-0,02 ± 0,144
	60	Sin magnesio con EGTA	0,06 ± 0,090	0,97 ± 0,068	0,72 ± 0,126	0,32 ± 0,087
	60	Con EGTA	-0,25 ± 0,082	0,50 ± 0,135	0,37 ± 0,152	-0,17 ± 0,089
OSV 1	15	Control	-0,41 ± 0,045	0,53 ± 0,098	0,43 ± 0,080	-0,33 ± 0,049
	30		-1,14 ± 0,077	0,65 ± 0,138	0,69 ± 0,094	-0,81 ± 0,082
	60		-0,78 ± 0,065	0,78 ± 0,085	0,54 ± 0,071	-0,41 ± 0,068
	15	Sin Calcio	0,15 ± 0,037	0,60 ± 0,066	0,39 ± 0,086	0,18 ± 0,040
	30		0,03 ± 0,066	0,97 ± 0,144	0,26 ± 0,263	0,07 ± 0,072
	60		0,12 ± 0,048	0,52 ± 0,079	0,11 ± 0,121	0,15 ± 0,052
	60	Sin calcio con EGTA	0,29 ± 0,051	0,91 ± 0,122	0,43 ± 0,176	0,31 ± 0,055
	15	Sin Magnesio	-0,04 ± 0,042	0,87 ± 0,068	0,35 ± 0,081	0,04 ± 0,046
	30		-0,41 ± 0,060	0,73 ± 0,086	0,56 ± 0,109	-0,25 ± 0,065
	60		-0,28 ± 0,053	0,68 ± 0,087	0,34 ± 0,089	-0,17 ± 0,058
	60	Sin magnesio con EGTA	-0,14 ± 0,053	0,90 ± 0,068	0,45 ± 0,060	0,04 ± 0,055
	15	Con EGTA	-0,09 ± 0,086	0,83 ± 0,178	0,61 ± 0,143	0,00 ± 0,094
60	-0,49 ± 0,060		0,65 ± 0,084	0,80 ± 0,065	-0,16 ± 0,063	

Tabla S2.7 cont: Componentes principales de la velocidad espermática

Medio	TIEMPO (min)	MUESTRA	Progresivos	Intermedios	Hiperactivos	Total vigorosos
NC	15	Control	0,24 ± 0,082	-0,68 ± 0,085	-1,68 ± 0,142	0,06 ± 0,084
	30		0,13 ± 0,083	-0,75 ± 0,064	-1,59 ± 0,064	-0,25 ± 0,077
	60		0,17 ± 0,051	-0,86 ± 0,063	-1,65 ± 0,061	0,04 ± 0,052
	60	Sin calcio	0,07 ± 0,060	-0,83 ± 0,052	-1,67 ± 0,048	-0,22 ± 0,058
	60	Sin calcio con EGTA	0,26 ± 0,069	-0,89 ± 0,066	-1,60 ± 0,069	-0,04 ± 0,069
	60	Sin magnesio	-0,26 ± 0,119	-0,68 ± 0,161	-1,85 ± 0,142	-0,41 ± 0,124
	60	Sin magnesio con EGTA	-0,12 ± 0,080	-0,69 ± 0,051	-1,50 ± 0,086	-0,35 ± 0,073
	60	Con EGTA	0,01 ± 0,073	-0,96 ± 0,100	-1,66 ± 0,097	-0,14 ± 0,076
OSV 2	15	Control	0,29 ± 0,040	-1,00 ± 0,071	-1,69 ± 0,049	0,11 ± 0,042
	30		0,17 ± 0,069	-0,85 ± 0,104	-1,76 ± 0,062	-0,13 ± 0,070
	60		-0,29 ± 0,057	-0,83 ± 0,059	-1,81 ± 0,036	-0,62 ± 0,053
	15	Sin Calcio	0,29 ± 0,033	-0,81 ± 0,048	-1,56 ± 0,057	0,16 ± 0,035
	30		0,42 ± 0,059	-0,74 ± 0,109	-1,55 ± 0,184	0,34 ± 0,063
	60		0,11 ± 0,043	-0,90 ± 0,056	-1,72 ± 0,081	-0,01 ± 0,045
CAP	60	Sin calcio con EGTA	0,86 ± 0,045	-0,62 ± 0,090	-1,53 ± 0,121	0,78 ± 0,048
	15	Sin Magnesio	0,38 ± 0,038	-0,72 ± 0,047	-1,69 ± 0,051	0,21 ± 0,039
	30		0,15 ± 0,053	-0,85 ± 0,062	-1,47 ± 0,073	-0,03 ± 0,055
	60		0,00 ± 0,047	-0,82 ± 0,062	-1,64 ± 0,056	-0,16 ± 0,049
	60	Sin magnesio con EGTA	0,10 ± 0,047	-0,75 ± 0,048	-1,68 ± 0,038	-0,22 ± 0,046
	15	Con EGTA	0,26 ± 0,077	-0,76 ± 0,136	-1,52 ± 0,101	0,09 ± 0,082
60	0,02 ± 0,054		-0,89 ± 0,060	-1,69 ± 0,040	-0,36 ± 0,052	

Promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación de los componentes principales de la velocidad (OSV1 y 2), tras 60 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), en presencia o ausencia de calcio, magnesio o EGTA.

Tabla S2.8: Componentes principales de la trayectoria espermática

Medio	TIEMPO (min)	MUESTRA	Progresivos	Intermedios	Hiperactivos	Total vigorosos	
NC	15	Control	0,52 ± 0,084	-0,28 ± 0,088	-1,01 ± 0,158	0,37 ± 0,087	
	30		0,28 ± 0,086	-0,45 ± 0,070	-0,89 ± 0,071	0,00 ± 0,081	
	60		0,31 ± 0,054	-0,56 ± 0,068	-1,05 ± 0,066	0,20 ± 0,055	
	60	Sin calcio	0,20 ± 0,063	-0,54 ± 0,059	-1,05 ± 0,053	-0,02 ± 0,062	
	60	Sin calcio con EGTA	0,25 ± 0,072	-0,74 ± 0,072	-1,09 ± 0,075	0,02 ± 0,072	
	60	Sin magnesio	-0,20 ± 0,123	-0,44 ± 0,170	-1,27 ± 0,158	-0,30 ± 0,129	
	60	Sin magnesio con EGTA	-0,12 ± 0,083	-0,39 ± 0,054	-0,99 ± 0,095	-0,24 ± 0,077	
	60	Con EGTA	0,11 ± 0,076	-0,67 ± 0,110	-1,14 ± 0,107	-0,01 ± 0,080	
	OTS 1	15	Control	0,22 ± 0,041	-1,12 ± 0,080	-1,64 ± 0,052	0,05 ± 0,044
		30		0,08 ± 0,071	-1,10 ± 0,110	-1,70 ± 0,068	-0,20 ± 0,073
60		-0,38 ± 0,059		-1,01 ± 0,072	-1,75 ± 0,037	-0,69 ± 0,056	
15		Sin Calcio	0,26 ± 0,034	-0,80 ± 0,054	-1,18 ± 0,063	0,15 ± 0,036	
30			0,42 ± 0,061	-0,56 ± 0,115	-1,10 ± 0,204	0,36 ± 0,065	
60			0,15 ± 0,045	-0,80 ± 0,065	-1,23 ± 0,088	0,05 ± 0,047	
60		Sin calcio con EGTA	0,90 ± 0,047	-0,66 ± 0,098	-1,01 ± 0,134	0,83 ± 0,050	
CAP		15	Sin Magnesio	0,26 ± 0,039	-0,81 ± 0,056	-1,37 ± 0,055	0,11 ± 0,041
		30		-0,02 ± 0,055	-0,97 ± 0,070	-1,35 ± 0,079	-0,18 ± 0,058
		60		-0,15 ± 0,049	-0,95 ± 0,072	-1,47 ± 0,061	-0,30 ± 0,051
	60	Sin magnesio con EGTA	-0,02 ± 0,049	-0,98 ± 0,055	-1,51 ± 0,041	-0,32 ± 0,049	
	15	Con EGTA	0,12 ± 0,079	-0,65 ± 0,141	-1,49 ± 0,112	-0,03 ± 0,085	
	60		-0,08 ± 0,056	-1,08 ± 0,068	-1,72 ± 0,042	-0,45 ± 0,055	

Tabla S2.8 cont.: Componentes principales de la trayectoria espermática

Medio	TIEMPO (min)	MUESTRA	Progresivos	Intermedios	Hiperactivos	Total vigorosos	
NC	15	Control	0,53 ± 0,085	0,74 ± 0,174	-0,29 ± 0,341	0,53 ± 0,105	
	30		0,42 ± 0,087	0,85 ± 0,135	0,33 ± 0,158	0,48 ± 0,105	
	60		0,45 ± 0,056	0,88 ± 0,133	0,01 ± 0,165	0,45 ± 0,065	
	60	Sin calcio	0,52 ± 0,065	0,79 ± 0,112	0,14 ± 0,124	0,51 ± 0,077	
	60	Sin calcio con EGTA	0,38 ± 0,073	0,53 ± 0,139	-0,06 ± 0,176	0,36 ± 0,090	
	60	Sin magnesio	0,50 ± 0,125	1,15 ± 0,333	-0,51 ± 0,341	0,48 ± 0,156	
	60	Sin magnesio con EGTA	0,44 ± 0,085	0,85 ± 0,106	0,38 ± 0,211	0,53 ± 0,098	
	60	Con EGTA	0,34 ± 0,077	0,93 ± 0,212	-0,03 ± 0,253	0,35 ± 0,095	
	OTS 2	15	Control	-0,23 ± 0,042	-0,02 ± 0,153	-0,52 ± 0,133	-0,24 ± 0,052
		30		-0,73 ± 0,072	0,18 ± 0,216	-0,76 ± 0,157	-0,69 ± 0,091
60		-0,83 ± 0,061		-0,46 ± 0,132	-0,68 ± 0,116	-0,78 ± 0,077	
15		Sin Calcio	0,33 ± 0,035	0,50 ± 0,104	-0,15 ± 0,144	0,32 ± 0,042	
30			0,14 ± 0,062	0,63 ± 0,226	-0,94 ± 0,443	0,15 ± 0,074	
60			0,51 ± 0,045	0,77 ± 0,123	-0,04 ± 0,203	0,51 ± 0,055	
60		Sin calcio con EGTA	0,09 ± 0,048	0,38 ± 0,191	-0,52 ± 0,295	0,09 ± 0,055	
15		Sin Magnesio	-0,15 ± 0,040	0,01 ± 0,106	-0,59 ± 0,136	-0,16 ± 0,049	
30			-0,43 ± 0,056	-0,05 ± 0,134	-0,19 ± 0,183	-0,38 ± 0,070	
60			-0,50 ± 0,050	-0,18 ± 0,136	-0,46 ± 0,150	-0,47 ± 0,062	
60	Sin magnesio con EGTA	-0,60 ± 0,050	-0,29 ± 0,106	-0,85 ± 0,101	-0,60 ± 0,062		
CAP	15	Con EGTA	-0,11 ± 0,080	0,12 ± 0,279	-0,21 ± 0,241	-0,11 ± 0,101	
	60		-0,42 ± 0,057	-0,05 ± 0,131	-0,11 ± 0,108	-0,33 ± 0,072	

Promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación de los componentes principales de la velocidad (OSV1 y 2) y de la trayectoria (OTS1 y 2), tras 60 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), en suspensiones espermáticas centrifugadas o no.



**Tabla S3.1** Porcentaje de espermatozoides móviles

Tiempo	CONTROL (1.71 $\mu$ m CaCl <sub>2</sub> , 0 $\mu$ m ACC)	0 $\mu$ m CaCl <sub>2</sub>															
		0 $\mu$ m ACC		0.8 $\mu$ m ACC		1.2 $\mu$ m ACC		1.71 $\mu$ m ACC		3.4 $\mu$ m ACC							
NC	15	65,00 <sup>b</sup> $\pm$ 7,124	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --
	30	80,00 <sup>bc</sup> $\pm$ 7,124	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --
	60	90,00 <sup>bc</sup> $\pm$ 9,876	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --
CAP	15	70,00 <sup>bc</sup> $\pm$ 5,922	73,33 <sup>c</sup> $\pm$ 5,922	75,00 <sup>bc</sup> $\pm$ 5,922	75,33 <sup>bc</sup> $\pm$ 5,922	72,50 <sup>bc</sup> $\pm$ 7,123	45,00 <sup>a</sup> $\pm$ 9,897										
	30	71,75 <sup>c</sup> $\pm$ 5,206	80,00 <sup>bc</sup> $\pm$ 5,206	70,75 <sup>bc</sup> $\pm$ 5,206	75,00 <sup>bc</sup> $\pm$ 5,206	68,75 <sup>bc</sup> $\pm$ 5,206	40,00 <sup>a</sup> $\pm$ 9,897										
	60	62,50 <sup>b</sup> $\pm$ 5,206	66,67 <sup>bc</sup> $\pm$ 5,914	78,25 <sup>c</sup> $\pm$ 5,206	72,50 <sup>bc</sup> $\pm$ 5,206	61,25 <sup>bc</sup> $\pm$ 5,206	40,00 <sup>a</sup> $\pm$ 9,897										

Promedio  $\pm$  S.E.M calculado por el SPSS, de la variación en el porcentaje de espermatozoides móviles a lo largo de la incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), en suspensiones espermáticas a distinta concentración de carbonato cálcico amorfo (ACC). Los niveles de significación se indican mediante letras.

**Tabla S3.2:** Porcentaje de espermatozoides vivos y estatus acrosómico

Tiempo	Control	0mM	0.8mM	1.2mM	1.71mM	
Porcentaje de espermatozoides vivos con el acrosoma intacto						
A	30	75,75 <sup>c</sup> $\pm$ 1,443	82,75 <sup>d</sup> $\pm$ 9,948	73,75 <sup>c</sup> $\pm$ 8,047	77,00 <sup>c</sup> $\pm$ 7,902	60,21 <sup>b</sup> $\pm$ 5,668
	60	50,50 <sup>a</sup> $\pm$ 1,795	82,50 <sup>d</sup> $\pm$ 7,839	60,50 <sup>b</sup> $\pm$ 8,913	64,00 <sup>b</sup> $\pm$ 5,888	48,00 <sup>ab</sup> $\pm$ 10,011
Porcentaje de espermatozoides vivos sin acrosoma						
B	30	24,25 <sup>b</sup> $\pm$ 1,443	17,25 <sup>a</sup> $\pm$ 9,948	26,25 <sup>b</sup> $\pm$ 8,047	23,00 <sup>b</sup> $\pm$ 7,902	39,79 <sup>c</sup> $\pm$ 5,668
	60	49,50 <sup>d</sup> $\pm$ 1,795	17,50 <sup>a</sup> $\pm$ 7,839	39,50 <sup>c</sup> $\pm$ 8,913	36,00 <sup>c</sup> $\pm$ 5,888	52,00 <sup>cd</sup> $\pm$ 10,011

Promedio  $\pm$  S.E.M calculado por el SPSS, de la variación en el porcentaje de espermatozoides vivos con el acrosoma intacto (A), o sin acrosoma (B), tras 30 o 60 min de incubación en condiciones capacitantes (CAP), en suspensiones espermáticas a distinta concentración de carbonato cálcico amorfo (ACC). Los niveles de significación se indican mediante letras.

**Tabla S3.3:** Porcentaje de cada clase espermática

Clase	Tiempo	1.71 $\mu\text{M}$ $\text{CaCl}_2$		CAP / 0 $\mu\text{M}$ $\text{CaCl}_2$			
		Control de supervivencia	Control Capacitante	0 $\mu\text{M}$ ACC	0.8 $\mu\text{M}$ ACC	1.2 $\mu\text{M}$ ACC	1.71 $\mu\text{M}$ ACC
<b>Progresivos</b>	15	80,80 <sup>b</sup> $\pm$ 9,922	75,89 <sup>b</sup> $\pm$ 5,188 <sup>c</sup>	78,10 <sup>b</sup> $\pm$ 6,215	80,35 <sup>b</sup> $\pm$ 6,215	62,40 <sup>ab</sup> $\pm$ 6,215	71,27 <sup>b</sup> $\pm$ 7,324
	30	63,47 <sup>ab</sup> $\pm$ 7,323	71,35 <sup>b</sup> $\pm$ 5,570	70,98 <sup>b</sup> $\pm$ 5,570	67,12 <sup>b</sup> $\pm$ 5,570	62,13 <sup>ab</sup> $\pm$ 5,570	54,39 <sup>a</sup> $\pm$ 5,570
	60	60,97 <sup>ab</sup> $\pm$ 5,693	55,93 <sup>ab</sup> $\pm$ 5,188	68,32 <sup>b</sup> $\pm$ 7,330	67,28 <sup>b</sup> $\pm$ 5,570	60,39 <sup>b</sup> $\pm$ 5,570	62,32 <sup>b</sup> $\pm$ 5,570
<b>Intermedios</b>	15	12,80 <sup>a</sup> $\pm$ 8,164	12,57 <sup>a</sup> $\pm$ 4,245	16,00 <sup>a</sup> $\pm$ 5,097	10,18 <sup>a</sup> $\pm$ 5,097	18,30 <sup>a</sup> $\pm$ 5,097	15,09 <sup>a</sup> $\pm$ 6,015
	30	29,65 <sup>b</sup> $\pm$ 6,015	14,14 <sup>a</sup> $\pm$ 4,562	23,15 <sup>ab</sup> $\pm$ 4,562	14,99 <sup>a</sup> $\pm$ 4,562	16,75 <sup>a</sup> $\pm$ 4,562	17,10 <sup>a</sup> $\pm$ 4,562
	60	24,97 $\pm$ 4,664	14,27 <sup>a</sup> $\pm$ 4,245	23,45 <sup>ab</sup> $\pm$ 6,020	17,45 <sup>ab</sup> $\pm$ 4,562	16,68 <sup>ab</sup> $\pm$ 4,562	13,04 <sup>a</sup> $\pm$ 4,562
<b>Hiperactivos</b>	15	6,40 <sup>a</sup> $\pm$ 7,749	11,53 <sup>b</sup> $\pm$ 3,466	5,90 <sup>a</sup> $\pm$ 4,474	9,47 <sup>a</sup> $\pm$ 4,474	19,30 <sup>b</sup> $\pm$ 4,474	13,64 <sup>ab</sup> $\pm$ 5,479
	30	6,87 <sup>a</sup> $\pm$ 5,479	14,51 <sup>b</sup> $\pm$ 3,875	5,87 <sup>a</sup> $\pm$ 3,875	17,89 <sup>b</sup> $\pm$ 3,875	21,11 <sup>bc</sup> $\pm$ 3,875	28,50 <sup>c</sup> $\pm$ 3,875
	60	14,05 <sup>ab</sup> $\pm$ 3,875	29,79 $\pm$ 3,466	8,23 <sup>a</sup> $\pm$ 5,479	15,27 <sup>ab</sup> $\pm$ 3,875	22,92 $\pm$ 3,875	24,64 $\pm$ 3,875

Valor promedio  $\pm$  S.E.M calculado por el SPSS, de la variación en el porcentaje de cada clase espermática (progresivos, intermedios o hiperactivos), a lo largo de la incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), en suspensiones espermáticas a distinta concentración de carbonato cálcico amorfo (ACC). Los niveles de significación en cada clase, se indican mediante letras.

**Tabla S3.4:** Promedio de la intensidad relativa de la señal

	Tiempo (min)	1.71 $\mu\text{M}$ $\text{CaCl}_2$		CAP / 0 $\mu\text{M}$ $\text{CaCl}_2$			
		Control NC	Control CAP	0 $\mu\text{M}$ ACC	0.8 $\mu\text{M}$ ACC	1.2 $\mu\text{M}$ ACC	1.71 $\mu\text{M}$ ACC
<b>PKA</b>	30	66,53 <sup>b</sup> $\pm$ 45,05	100 <sup>b</sup> $\pm$ 0,000	124,61 <sup>b</sup> $\pm$ 32,780	107,54 <sup>b</sup> $\pm$ 32,780	129,24 <sup>b</sup> $\pm$ 32,780	120,03 <sup>b</sup> $\pm$ 45,130
	60	27,39 <sup>a</sup> $\pm$ 27,49	100 <sup>b</sup> $\pm$ 0,000	90,29 <sup>b</sup> $\pm$ 32,910	125,07 <sup>b</sup> $\pm$ 32,910	275,25 <sup>c</sup> $\pm$ 45,140	153,32 <sup>b</sup> $\pm$ 24,463
<b>pY</b>	30	91,21 <sup>bc</sup> $\pm$ 27,58	100 <sup>b</sup> $\pm$ 0,000	94,97 <sup>bc</sup> $\pm$ 20,710	119,18 <sup>bc</sup> $\pm$ 20,710	141,70 <sup>c</sup> $\pm$ 20,710	199,86 <sup>d</sup> $\pm$ 20,710
	60	61,16 <sup>a</sup> $\pm$ 15,10	100 <sup>b</sup> $\pm$ 0,000	48,98 <sup>a</sup> $\pm$ 15,068	105,81 <sup>bc</sup> $\pm$ 15,080	119,63 <sup>c</sup> $\pm$ 15,068	102,04 <sup>bc</sup> $\pm$ 13,373

Promedio  $\pm$  S.E.M calculado por el SPSS, de la intensidad relativa de la señal de los *Blots* realizados para determinar la fosforilación de proteínas diana de la proteína quinasa A (pPKA) y de las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina (pY), a los 60 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), a distinta concentración de carbonato cálcico amorfo (ACC). Los niveles de significación, de cada tipo de proteínas, se indican mediante letras.

Tabla S3.5: Parámetros de la velocidad espermática

CLASE	Muestra	Tiempo (min)	VAP	VSL	VCL	
Espermatozoides progresivos	CAPc	15	101,44 ± 3,500	78,95 ± 3,613	204,50 ± 6,048	
		30	97,67 ± 3,418	76,50 ± 3,528	197,26 ± 5,889	
		60	82,68 ± 3,156	59,32 ± 3,256	176,07 ± 5,382	
	0 µM Ca	15	118,41 ± 3,322	100,12 ± 2,157	244,10 ± 7,343	
		30	123,85 ± 3,069	106,70 ± 2,573	257,12 ± 6,636	
		60	109,56 ± 3,068	92,81 ± 3,216	248,10 ± 6,426	
	0.8 µM ACC	15	138,63 ± 2,997	122,72 ± 3,145	268,39 ± 6,286	
		30	107,39 ± 2,786	84,72 ± 2,887	212,63 ± 4,919	
		60	101,19 ± 2,845	79,08 ± 2,935	207,80 ± 4,777	
	1.2 µM ACC	15	110,79 ± 3,225	85,79 ± 3,332	219,28 ± 5,520	
		30	94,67 ± 3,213	69,79 ± 3,318	196,06 ± 5,499	
		60	87,56 ± 2,653	63,27 ± 2,743	185,97 ± 4,425	
	1.71 µM ACC	15	103,62 ± 2,941	76,58 ± 3,041	206,08 ± 4,974	
		30	93,61 ± 2,974	70,24 ± 3,072	196,56 ± 5,030	
		60	80,72 ± 2,954	53,98 ± 3,054	165,91 ± 4,994	
	Espermatozoides intermedios	CAPc	15	124,76 ± 3,120	80,84 ± 3,220	282,59 ± 5,320
			30	116,32 ± 3,215	79,82 ± 3,315	285,48 ± 5,485
			60	109,06 ± 3,148	70,44 ± 3,248	270,10 ± 5,371
0 µM Ca		15	132,16 ± 3,063	102,15 ± 1,984	327,39 ± 6,825	
		30	138,91 ± 4,150	110,79 ± 2,733	341,06 ± 8,895	
		60	132,22 ± 3,261	108,98 ± 2,117	348,83 ± 7,209	
0.8 µM ACC		15	144,10 ± 2,650	108,07 ± 2,789	334,27 ± 5,688	
		30	123,92 ± 2,515	77,52 ± 2,655	273,52 ± 5,443	
		60	130,75 ± 2,626	93,51 ± 2,768	304,33 ± 5,633	
1.2 µM ACC		15	125,83 ± 2,910	77,17 ± 3,000	276,79 ± 4,910	
		30	119,03 ± 2,948	76,03 ± 3,044	277,51 ± 4,986	
		60	120,62 ± 2,993	82,24 ± 3,093	292,34 ± 5,070	
1.71 µM ACC		15	123,82 ± 2,780	77,42 ± 2,870	275,25 ± 4,650	
		30	116,62 ± 2,827	76,81 ± 2,920	279,40 ± 4,747	
		60	116,66 ± 2,910	70,96 ± 3,010	262,67 ± 4,920	

Tabla S3.5 cont: Parámetros de la velocidad espermática

CLASE	Muestra	Tiempo (min)	VAP	VSL	VCL	
Espermatozoides hiperactivos	CAPc	15	124,76 ± 3,008	80,84 ± 3,108	282,59 ± 5,097	
		30	116,32 ± 3,090	79,82 ± 3,190	285,48 ± 5,260	
		60	109,06 ± 3,120	70,44 ± 3,220	270,10 ± 5,315	
	0 µM Ca	15	132,16 ± 4,582	102,15 ± 3,035	327,39 ± 9,708	
		30	138,91 ± 3,913	110,79 ± 2,573	341,06 ± 8,436	
		60	132,22 ± 3,206	108,98 ± 2,082	348,83 ± 7,084	
	0.8 µM ACC	15	144,10 ± 2,150	108,07 ± 2,280	334,27 ± 4,784	
		30	123,92 ± 2,192	77,52 ± 2,325	273,52 ± 4,878	
		60	130,75 ± 2,739	93,51 ± 2,879	304,33 ± 5,826	
	1.2 µM ACC	15	125,83 ± 2,838	77,17 ± 2,935	276,79 ± 4,773	
		30	119,03 ± 2,854	76,03 ± 2,950	277,51 ± 4,799	
		60	120,62 ± 2,889	82,24 ± 2,979	292,34 ± 4,862	
	1.71 µM ACC	15	123,82 ± 2,730	77,42 ± 2,820	275,25 ± 4,550	
		30	116,62 ± 2,745	76,81 ± 2,835	279,40 ± 4,581	
		60	116,66 ± 2,780	70,96 ± 2,870	262,67 ± 4,650	
	Total espermatozoides vigorosos	CAPc	15	106,32 ± 3,385	74,55 ± 3,494	222,09 ± 5,825
			30	100,43 ± 3,349	72,91 ± 3,456	216,78 ± 5,755
			60	93,98 ± 3,143	58,05 ± 3,243	230,22 ± 5,358
0 µM Ca		15	120,05 ± 3,355	97,59 ± 2,182	259,90 ± 7,400	
		30	125,62 ± 3,342	104,03 ± 2,606	275,41 ± 7,210	
		60	116,29 ± 3,150	94,49 ± 2,724	285,69 ± 6,765	
0.8 µM ACC		15	137,70 ± 2,883	115,14 ± 3,028	277,57 ± 6,085	
		30	110,74 ± 2,650	77,15 ± 2,762	228,66 ± 4,985	
		60	108,65 ± 2,788	77,40 ± 2,895	236,00 ± 5,094	
1.2 µM ACC		15	114,99 ± 3,098	76,45 ± 3,200	236,63 ± 5,275	
		30	101,11 ± 3,091	65,53 ± 3,192	223,69 ± 5,261	
		60	98,91 ± 2,776	63,83 ± 2,868	229,33 ± 4,655	
1.71 µM ACC		15	107,82 ± 2,892	72,64 ± 2,989	222,27 ± 4,875	
		30	100,43 ± 2,884	65,02 ± 2,979	235,71 ± 4,853	
		60	89,91 ± 2,901	52,23 ± 2,999	200,08 ± 4,891	

Valor promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación de los parámetros de la velocidad espermática, en cada clase espermática, tras 60 min de incubación en condiciones capacitantes (CAP), a distinta concentración de carbonato cálcico amorfo (ACC).

Tabla S3.6: Parámetros de la trayectoria espermática

CLASE	Muestra	Tiempo (min)	ALH	BCF	STR	LIN	WOB	
Espermatozoides progresivos	CAPc	15	7,30 ± 0,219	19,11 ± 0,005	74,14 ± 0,010	37,17 ± 0,467	49,68 ± 0,004	
		30	7,43 ± 0,214	18,79 ± 0,006	75,66 ± 0,012	38,09 ± 0,450	49,91 ± 0,005	
		60	7,06 ± 0,202	17,63 ± 0,007	67,25 ± 0,013	32,35 ± 0,401	46,96 ± 0,006	
	0 µM Ca	15	7,21 ± 0,434	25,31 ± 0,005	81,47 ± 0,010	39,56 ± 0,616	48,07 ± 0,004	
		30	7,61 ± 0,370	23,35 ± 0,004	82,82 ± 0,008	39,95 ± 0,632	47,72 ± 0,003	
		60	7,92 ± 0,328	22,61 ± 0,009	81,64 ± 0,018	36,38 ± 0,695	44,26 ± 0,007	
	0.8 µM ACC	15	7,90 ± 0,321	21,87 ± 0,005	86,16 ± 0,010	44,76 ± 0,680	51,65 ± 0,004	
		30	7,41 ± 0,204	19,20 ± 0,005	75,93 ± 0,010	39,00 ± 0,394	50,79 ± 0,004	
		60	7,09 ± 0,180	20,92 ± 0,006	74,63 ± 0,011	37,18 ± 0,344	49,49 ± 0,005	
	1.2 µM ACC	15	8,02 ± 0,204	18,29 ± 0,005	75,04 ± 0,010	38,25 ± 0,415	51,01 ± 0,004	
		30	7,37 ± 0,205	18,61 ± 0,005	71,18 ± 0,009	34,84 ± 0,412	48,49 ± 0,004	
		60	7,33 ± 0,170	18,47 ± 0,006	68,62 ± 0,011	32,85 ± 0,310	47,16 ± 0,005	
	1.71 µM ACC	15	8,02 ± 0,190	17,49 ± 0,008	71,73 ± 0,015	36,78 ± 0,364	51,11 ± 0,006	
		30	7,34 ± 0,192	18,49 ± 0,005	72,07 ± 0,010	34,95 ± 0,367	47,94 ± 0,004	
		60	7,31 ± 0,190	16,99 ± 0,007	64,44 ± 0,013	31,68 ± 0,360	49,13 ± 0,006	
	Espermatozoides intermedios	CAPc	15	10,53 ± 0,200	16,69 ± 0,005	64,59 ± 0,010	28,15 ± 0,390	44,40 ± 0,004
			30	11,29 ± 0,200	16,28 ± 0,006	68,21 ± 0,012	27,67 ± 0,407	40,72 ± 0,005
			60	12,04 ± 0,200	14,89 ± 0,007	64,14 ± 0,013	25,72 ± 0,402	40,52 ± 0,006
0 µM Ca		15	9,96 ± 0,406	21,91 ± 0,005	76,59 ± 0,009	30,73 ± 0,566	40,32 ± 0,004	
		30	9,96 ± 0,509	21,71 ± 0,004	79,21 ± 0,008	32,14 ± 0,779	40,66 ± 0,003	
		60	10,61 ± 0,428	21,20 ± 0,009	82,03 ± 0,018	31,04 ± 0,601	37,93 ± 0,007	
0.8 µM ACC		15	10,31 ± 0,300	20,79 ± 0,005	74,39 ± 0,010	31,70 ± 0,615	43,17 ± 0,004	
		30	10,75 ± 0,295	16,57 ± 0,005	62,47 ± 0,010	28,00 ± 0,591	45,47 ± 0,004	
		60	10,88 ± 0,301	18,02 ± 0,006	70,55 ± 0,011	30,14 ± 0,608	43,17 ± 0,005	
1.2 µM ACC		15	11,31 ± 0,180	14,62 ± 0,005	61,06 ± 0,009	27,45 ± 0,360	45,61 ± 0,004	
		30	10,70 ± 0,185	16,61 ± 0,005	63,58 ± 0,009	27,06 ± 0,365	43,02 ± 0,004	
		60	11,81 ± 0,190	15,97 ± 0,006	67,65 ± 0,011	27,70 ± 0,370	41,25 ± 0,005	
1.71 µM ACC		15	12,00 ± 0,180	13,92 ± 0,008	62,59 ± 0,015	27,95 ± 0,320	45,09 ± 0,006	
		30	10,88 ± 0,184	16,48 ± 0,005	65,66 ± 0,010	27,14 ± 0,334	41,87 ± 0,004	
		60	12,46 ± 0,190	13,07 ± 0,007	60,25 ± 0,013	26,54 ± 0,360	44,54 ± 0,006	

Tabla S3.6 cont: Parámetros de la trayectoria espermática

CLASE	Muestra	Tiempo (min)	ALH	BCF	STR	LIN	WOB	
Espermatozoides hiperactivos	CAPc	15	10,53 ± 0,193	16,69 ± 0,005	64,59 ± 0,010	28,15 ± 0,370	44,40 ± 0,004	
		30	11,29 ± 0,200	16,28 ± 0,006	68,21 ± 0,012	27,67 ± 0,390	40,72 ± 0,005	
		60	12,04 ± 0,200	14,89 ± 0,007	64,14 ± 0,013	25,72 ± 0,396	40,52 ± 0,006	
	0 µM Ca	15	9,96 ± 0,550	21,91 ± 0,005	76,59 ± 0,010	30,73 ± 0,862	40,32 ± 0,004	
		30	9,96 ± 0,490	21,71 ± 0,004	79,21 ± 0,008	32,14 ± 0,733	40,66 ± 0,003	
		60	10,61 ± 0,418	21,20 ± 0,009	82,03 ± 0,018	31,04 ± 0,594	37,93 ± 0,007	
	0.8 µM ACC	15	10,31 ± 0,270	20,79 ± 0,005	74,39 ± 0,010	31,70 ± 0,520	43,17 ± 0,004	
		30	10,75 ± 0,273	16,57 ± 0,005	62,47 ± 0,010	28,00 ± 0,533	45,47 ± 0,004	
		60	10,88 ± 0,306	18,02 ± 0,006	70,55 ± 0,011	30,14 ± 0,632	43,17 ± 0,005	
	1.2 µM ACC	15	11,31 ± 0,180	14,62 ± 0,005	61,06 ± 0,009	27,45 ± 0,340	45,61 ± 0,004	
		30	10,70 ± 0,180	16,61 ± 0,005	63,58 ± 0,009	27,06 ± 0,345	43,02 ± 0,004	
		60	11,81 ± 0,180	15,97 ± 0,005	67,65 ± 0,011	27,70 ± 0,355	41,25 ± 0,005	
	1.71 µM ACC	15	12,00 ± 0,180	13,92 ± 0,008	62,59 ± 0,015	27,95 ± 0,320	45,09 ± 0,006	
		30	10,88 ± 0,180	16,48 ± 0,005	65,66 ± 0,010	27,14 ± 0,320	41,87 ± 0,004	
		60	12,46 ± 0,180	13,07 ± 0,007	60,25 ± 0,013	26,54 ± 0,320	44,54 ± 0,006	
	Total espermatozoides vigorosos	CAPc	15	8,22 ± 0,213	18,20 ± 0,005	68,16 ± 0,010	33,25 ± 0,444	48,28 ± 0,004
			30	8,46 ± 0,210	17,95 ± 0,006	70,73 ± 0,012	34,02 ± 0,437	47,31 ± 0,005
			60	9,90 ± 0,201	16,17 ± 0,007	60,29 ± 0,013	26,03 ± 0,399	42,04 ± 0,006
0 µM Ca		15	7,79 ± 0,436	24,61 ± 0,005	78,74 ± 0,010	36,83 ± 0,622	46,22 ± 0,004	
		30	8,20 ± 0,406	22,88 ± 0,004	79,96 ± 0,008	36,97 ± 0,668	45,64 ± 0,003	
		60	8,99 ± 0,372	21,58 ± 0,009	78,78 ± 0,018	32,72 ± 0,653	41,24 ± 0,007	
0.8 µM ACC		15	8,40 ± 0,314	21,64 ± 0,005	81,38 ± 0,010	41,02 ± 0,659	49,85 ± 0,004	
		30	8,39 ± 0,228	18,28 ± 0,005	68,18 ± 0,010	33,86 ± 0,445	48,97 ± 0,004	
		60	8,42 ± 0,222	19,78 ± 0,006	69,16 ± 0,011	32,93 ± 0,436	47,13 ± 0,005	
1.2 µM ACC		15	9,16 ± 0,196	16,98 ± 0,005	65,47 ± 0,010	32,35 ± 0,391	49,21 ± 0,004	
		30	8,59 ± 0,196	17,77 ± 0,005	63,86 ± 0,009	29,68 ± 0,390	45,85 ± 0,004	
		60	9,37 ± 0,176	17,30 ± 0,006	62,96 ± 0,011	28,11 ± 0,333	43,93 ± 0,005	
1.71 µM ACC		15	8,99 ± 0,187	16,68 ± 0,008	66,31 ± 0,015	33,04 ± 0,352	49,40 ± 0,006	
		30	9,34 ± 0,187	17,09 ± 0,005	63,62 ± 0,010	28,39 ± 0,348	43,72 ± 0,004	
		60	9,31 ± 0,187	15,39 ± 0,007	57,66 ± 0,013	26,79 ± 0,349	46,20 ± 0,006	

Valor promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación de los parámetros de la trayectoria espermática, en cada clase espermática, tras 60 min de incubación en condiciones capacitantes (CAP), a distinta concentración de carbonato cálcico amorfo (ACC).

Tabla S3.7: Variación de los Componentes Principales

	Tiempo (min)	CAPc	0 $\mu\text{m}$ ACC	0.8 $\mu\text{M}$ ACC	1.2 $\mu\text{M}$ ACC	1.71 $\mu\text{M}$ ACC	
OSV 1	Espermatozoides progresivos	15	-0,29 $\pm$ 0,067	0,18 $\pm$ 0,058	0,55 $\pm$ 0,056	-0,04 $\pm$ 0,052	-0,25 $\pm$ 0,057
		30	-0,36 $\pm$ 0,059	0,28 $\pm$ 0,059	-0,15 $\pm$ 0,049	-0,42 $\pm$ 0,057	-0,46 $\pm$ 0,061
		60	-0,82 $\pm$ 0,063	0,08 $\pm$ 0,053	-0,30 $\pm$ 0,049	-0,65 $\pm$ 0,062	-0,91 $\pm$ 0,071
	Espermatozoides intermedios	15	0,39 $\pm$ 0,063	0,71 $\pm$ 0,071	0,84 $\pm$ 0,043	0,36 $\pm$ 0,052	0,36 $\pm$ 0,058
		30	0,34 $\pm$ 0,063	0,85 $\pm$ 0,065	0,34 $\pm$ 0,044	0,30 $\pm$ 0,098	0,29 $\pm$ 0,058
		60	0,15 $\pm$ 0,065	0,82 $\pm$ 0,058	0,58 $\pm$ 0,046	0,39 $\pm$ 0,052	0,19 $\pm$ 0,056
	Espermatozoides hiperactivos	15	-0,17 $\pm$ 0,075	-0,08 $\pm$ 0,094	0,15 $\pm$ 0,051	-0,12 $\pm$ 0,045	-0,12 $\pm$ 0,062
		30	-0,25 $\pm$ 0,078	-0,21 $\pm$ 0,083	-0,13 $\pm$ 0,046	-0,22 $\pm$ 0,049	-0,12 $\pm$ 0,053
		60	-0,11 $\pm$ 0,064	-0,53 $\pm$ 0,149	-0,07 $\pm$ 0,042	-0,07 $\pm$ 0,051	-0,36 $\pm$ 0,056
	Total espermatozoides vigorosos	15	-0,18 $\pm$ 0,068	0,25 $\pm$ 0,062	0,54 $\pm$ 0,054	0,01 $\pm$ 0,051	-0,15 $\pm$ 0,058
		30	-0,25 $\pm$ 0,062	0,37 $\pm$ 0,062	-0,08 $\pm$ 0,048	-0,26 $\pm$ 0,062	-0,23 $\pm$ 0,058
		60	-0,40 $\pm$ 0,064	0,30 $\pm$ 0,062	-0,10 $\pm$ 0,047	-0,31 $\pm$ 0,057	-0,64 $\pm$ 0,065
OSV 2	Espermatozoides progresivos	15	0,53 $\pm$ 0,045	0,49 $\pm$ 0,050	0,70 $\pm$ 0,031	0,54 $\pm$ 0,035	0,51 $\pm$ 0,038
		30	0,64 $\pm$ 0,039	0,47 $\pm$ 0,046	0,61 $\pm$ 0,032	0,42 $\pm$ 0,038	0,43 $\pm$ 0,040
		60	0,32 $\pm$ 0,042	0,30 $\pm$ 0,030	0,55 $\pm$ 0,033	0,33 $\pm$ 0,042	0,40 $\pm$ 0,047
	Espermatozoides intermedios	15	-0,41 $\pm$ 0,064	-0,38 $\pm$ 0,023	-0,51 $\pm$ 0,034	-0,45 $\pm$ 0,039	-0,46 $\pm$ 0,042
		30	-0,35 $\pm$ 0,057	-0,44 $\pm$ 0,022	-0,52 $\pm$ 0,065	-0,52 $\pm$ 0,039	-0,49 $\pm$ 0,042
		60	-0,44 $\pm$ 0,050	-0,38 $\pm$ 0,025	-0,52 $\pm$ 0,035	-0,52 $\pm$ 0,037	-0,60 $\pm$ 0,043
	Espermatozoides hiperactivos	15	-1,67 $\pm$ 0,051	-1,55 $\pm$ 0,086	-1,50 $\pm$ 0,027	-1,70 $\pm$ 0,030	-1,55 $\pm$ 0,041
		30	-1,51 $\pm$ 0,052	-1,65 $\pm$ 0,073	-1,56 $\pm$ 0,025	-1,57 $\pm$ 0,032	-1,71 $\pm$ 0,036
		60	-1,71 $\pm$ 0,043	-1,83 $\pm$ 0,137	-1,61 $\pm$ 0,023	-1,52 $\pm$ 0,034	-1,68 $\pm$ 0,037
	Total espermatozoides vigorosos	15	0,11 $\pm$ 0,045	0,22 $\pm$ 0,054	0,38 $\pm$ 0,030	-0,05 $\pm$ 0,034	0,11 $\pm$ 0,038
		30	0,21 $\pm$ 0,041	0,17 $\pm$ 0,050	0,10 $\pm$ 0,030	-0,17 $\pm$ 0,042	-0,35 $\pm$ 0,039
		60	-0,51 $\pm$ 0,043	-0,14 $\pm$ 0,046	0,05 $\pm$ 0,030	-0,30 $\pm$ 0,038	-0,27 $\pm$ 0,043

Promedio  $\pm$  S.E.M calculado por el SPSS, de la variación de los componentes principales de la velocidad (OSV1 y 2), tras 60 min de incubación en condiciones capacitantes (CAP), a distinta concentración de carbonato cálcico amorfo (ACC).

**Tabla S3.8:** Variación de los Componentes Principales

		Tiempo (min)	CAPc	0 $\mu\text{m}$ Ca	0.8 $\mu\text{M}$ ACC	1.2 $\mu\text{M}$ ACC	1.71 $\mu\text{M}$ ACC	
<b>OTS 1</b>	Espermatozoides progresivos	15	0,10 $\pm$ 0,060	0,71 $\pm$ 0,057	0,88 $\pm$ 0,057	0,15 $\pm$ 0,060	-0,03 $\pm$ 0,076	
		30	0,15 $\pm$ 0,066	0,71 $\pm$ 0,054	0,21 $\pm$ 0,061	-0,07 $\pm$ 0,060	-0,04 $\pm$ 0,065	
		60	-0,32 $\pm$ 0,083	0,58 $\pm$ 0,097	0,18 $\pm$ 0,064	-0,20 $\pm$ 0,068	-0,45 $\pm$ 0,075	
	Espermatozoides intermedios	15	0,42 $\pm$ 0,062	0,31 $\pm$ 0,076	-0,49 $\pm$ 0,060	-0,44 $\pm$ 0,095	-0,31 $\pm$ 0,069	
		30	0,53 $\pm$ 0,052	-0,34 $\pm$ 0,068	-0,33 $\pm$ 0,060	-0,27 $\pm$ 0,063	-0,16 $\pm$ 0,081	
		60	0,62 $\pm$ 0,072	0,03 $\pm$ 0,065	-0,17 $\pm$ 0,065	-0,60 $\pm$ 0,095	-0,38 $\pm$ 0,075	
	Espermatozoides hiperactivos	15	-1,29 $\pm$ 0,066	-0,63 $\pm$ 0,088	-0,73 $\pm$ 0,074	-1,35 $\pm$ 0,055	-1,20 $\pm$ 0,091	
		30	-1,05 $\pm$ 0,076	-0,78 $\pm$ 0,076	-1,16 $\pm$ 0,059	-1,09 $\pm$ 0,050	-1,03 $\pm$ 0,048	
		60	-0,94 $\pm$ 0,058	-1,27 $\pm$ 0,139	-0,99 $\pm$ 0,067	-0,90 $\pm$ 0,053	-1,31 $\pm$ 0,061	
	Total espermatozoides vigorosos	15	-0,14 $\pm$ 0,062	0,58 $\pm$ 0,060	0,67 $\pm$ 0,061	-0,24 $\pm$ 0,059	-0,24 $\pm$ 0,081	
		30	-0,05 $\pm$ 0,069	0,59 $\pm$ 0,055	-0,09 $\pm$ 0,061	-0,33 $\pm$ 0,058	-0,36 $\pm$ 0,060	
		60	-0,53 $\pm$ 0,073	0,45 $\pm$ 0,091	-0,02 $\pm$ 0,065	-0,37 $\pm$ 0,064	-0,71 $\pm$ 0,073	
	<b>OTS 2</b>	Espermatozoides progresivos	15	0,19 $\pm$ 0,063	0,36 $\pm$ 0,063	0,42 $\pm$ 0,066	0,47 $\pm$ 0,082	0,47 $\pm$ 0,066
			30	0,12 $\pm$ 0,059	0,53 $\pm$ 0,066	0,39 $\pm$ 0,066	0,36 $\pm$ 0,071	0,49 $\pm$ 0,072
			60	-0,17 $\pm$ 0,104	0,48 $\pm$ 0,070	0,34 $\pm$ 0,074	0,54 $\pm$ 0,081	0,41 $\pm$ 0,090
Espermatozoides intermedios		15	-0,84 $\pm$ 0,052	-0,66 $\pm$ 0,064	-0,45 $\pm$ 0,050	-0,56 $\pm$ 0,082	-0,47 $\pm$ 0,058	
		30	-0,83 $\pm$ 0,042	-0,44 $\pm$ 0,057	-0,58 $\pm$ 0,050	-0,69 $\pm$ 0,052	-0,83 $\pm$ 0,069	
		60	-1,12 $\pm$ 0,061	-0,66 $\pm$ 0,054	-0,86 $\pm$ 0,054	-0,61 $\pm$ 0,082	-0,89 $\pm$ 0,063	
Espermatozoides hiperactivos		15	-0,78 $\pm$ 0,103	-0,70 $\pm$ 0,088	-0,34 $\pm$ 0,069	-0,50 $\pm$ 0,107	-0,45 $\pm$ 0,080	
		30	-0,81 $\pm$ 0,091	-0,44 $\pm$ 0,074	-0,64 $\pm$ 0,065	-1,06 $\pm$ 0,063	-0,85 $\pm$ 0,090	
		60	-0,68 $\pm$ 0,157	-0,73 $\pm$ 0,081	-0,98 $\pm$ 0,068	-0,83 $\pm$ 0,075	-1,25 $\pm$ 0,072	
Total espermatozoides vigorosos		15	-0,04 $\pm$ 0,063	0,15 $\pm$ 0,066	0,13 $\pm$ 0,064	0,21 $\pm$ 0,085	0,22 $\pm$ 0,067	
		30	-0,13 $\pm$ 0,058	0,24 $\pm$ 0,066	0,01 $\pm$ 0,063	-0,22 $\pm$ 0,065	0,14 $\pm$ 0,074	
		60	-0,56 $\pm$ 0,093	0,08 $\pm$ 0,069	-0,22 $\pm$ 0,069	0,03 $\pm$ 0,080	-0,38 $\pm$ 0,079	

Promedio  $\pm$  S.E.M calculado por el SPSS, de la variación de los componentes principales de la trayectoria (OTS1 y 2), tras 60 min de incubación en condiciones capacitantes (CAP), a distinta concentración de carbonato cálcico amorfo (ACC).



Tabla S4.1 Porcentaje de espermatozoides móviles

Tiempo (min)	Control	10Zn	50Zn	10T	50T	100T
NC	0	73,33 <sup>e</sup> ± 5,774	55,00 <sup>b-e</sup> ± 21,213	55,00 <sup>cd</sup> ± 21,213	-- ± --	50,00 <sup>c</sup> ± 0,000
	15	72,03 <sup>ef</sup> ± 13,198	65,30 <sup>c-e</sup> ± 15,361	60,76 <sup>c-e</sup> ± 24,386	-- ± --	75,00 <sup>e</sup> ± 0,000
	30	75,36 <sup>e</sup> ± 3,570	72,67 <sup>d-f</sup> ± 11,015	72,00 <sup>d-f</sup> ± 10,583	-- ± --	70,00 <sup>e</sup> ± 0,000
	45	71,67 <sup>ef</sup> ± 10,408	70,00 <sup>d-f</sup> ± 14,142	47,50 <sup>a-f</sup> ± 38,891	-- ± --	80,00 <sup>f</sup> ± 0,000
	60	69,47 <sup>e</sup> ± 4,715	63,12 <sup>b-e</sup> ± 11,840	64,67 <sup>de</sup> ± 8,523	-- ± --	50,00 <sup>c</sup> ± 0,000
CAP	0	75,00 <sup>e</sup> ± 5,000	70,00 <sup>e</sup> ± 0,000	63,33 <sup>de</sup> ± 11,547	50,00 <sup>c</sup> ± 0,000	70,00 <sup>e</sup> ± 0,000
	15	63,97 <sup>de</sup> ± 14,964	57,60 <sup>cd</sup> ± 19,913	61,13 <sup>de</sup> ± 13,066	50,00 <sup>c</sup> ± 0,000	72,50 <sup>e</sup> ± 3,536
	30	65,00 <sup>de</sup> ± 5,000	77,50 <sup>e</sup> ± 3,536	61,67 <sup>de</sup> ± 10,408	60,00 <sup>cd</sup> ± 14,142	78,33 <sup>f</sup> ± 2,887
	45	65,00 <sup>de</sup> ± 5,000	60,00 <sup>d</sup> ± 0,000	45,00 <sup>bc</sup> ± 7,071	65,00 <sup>b-e</sup> ± 21,213	30,00 <sup>a</sup> ± 0,000
	60	60,53 <sup>de</sup> ± 11,270	61,03 <sup>d</sup> ± 6,712	51,34 <sup>cd</sup> ± 19,653	56,44 <sup>c</sup> ± 11,343	48,83 <sup>abc</sup> ± 33,757

Valor promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación en el porcentaje de espermatozoides móviles, tras 60 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), a distinta concentración de zinc (Zn) o su quelante TPEN (T). Todas las concentraciones están indicadas en µM. Los niveles de significación se indican mediante letras.

Tabla S4.2 Porcentaje de espermatozoides vigorosos

Tiempo (min)	CONTROL	10Zn	10ZnCo10T	50Zn	50ZnCo50T
NC	15	85,03 <sup>g</sup> ± 4,248	71,72 <sup>f</sup> ± 1,714	67,07 <sup>f</sup> ± 0,378	63,62 <sup>def</sup> ± 10,226
	30	82,07 <sup>g</sup> ± 2,124	68,70 <sup>f</sup> ± 2,020	64,02 <sup>e</sup> ± 0,650	66,26 <sup>f</sup> ± 2,357
	60	83,09 <sup>g</sup> ± 2,415	61,90 <sup>e</sup> ± 2,283	55,11 <sup>d</sup> ± 1,336	67,83 <sup>f</sup> ± 0,802
CAP	15	82,11 <sup>g</sup> ± 6,682	48,11 <sup>b</sup> ± 0,492	50,82 <sup>c</sup> ± 0,300	56,59 <sup>d</sup> ± 0,378
	30	77,13 <sup>fg</sup> ± 5,550	55,75 <sup>d</sup> ± 2,020	47,68 <sup>b</sup> ± 0,650	53,72 <sup>d</sup> ± 2,159
	60	71,19 <sup>d-g</sup> ± 15,012	57,36 <sup>d</sup> ± 1,164	38,72 <sup>a</sup> ± 2,566	46,92 <sup>abc</sup> ± 17,272

Promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación en el porcentaje de espermatozoides vigorosos, del total de espermatozoides móviles, tras 60 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), a distinta concentración de zinc (Zn) o su quelante TPEN (T). Todas las concentraciones están indicadas en µM. Los niveles de significación se indican mediante letras.

50ZnCo50T: Co-incubación con 50 µM de zinc y 50 µM de TPEN.

**Tabla S4.3:** Porcentaje de espermatozoides formando agrupaciones espermáticas

	CONTROL	10Zn	50Zn	10T	50T	100T
<b>NC</b>	52,67 <sup>cd</sup> ± 2,603	39,46 <sup>b</sup> ± 0,611	52,48 <sup>d</sup> ± 1,703	-- ± --	-- ± --	42,44 <sup>c</sup> ± 2,782
<b>CAP</b>	47,46 <sup>d</sup> ± 3,681	40,68 <sup>b</sup> ± 0,864	45,29 <sup>d</sup> ± 2,237	32,39 <sup>a</sup> ± 1,601	37,77 <sup>b</sup> ± 1,866	48,00 <sup>d</sup> ± 3,934
	10ZnCo10T	50ZnCo50T	10Tpost10Zn	50Tpost50Zn	--	ETANOL
<b>NC</b>	58,05 <sup>e</sup> ± 3,341	55,14 <sup>de</sup> ± 9,713	48,91 <sup>cd</sup> ± 4,278	42,12 <sup>c</sup> ± 2,089	--	-- ± --
<b>CAP</b>	51,37 <sup>c</sup> ± 4,724	35,71 <sup>abc</sup> ± 13,736	40,35 <sup>c</sup> ± 6,050	46,30 <sup>cd</sup> ± 2,954	--	31,61 <sup>a</sup> ± 2,127

Promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, en el porcentaje de células formando agrupaciones, del total de espermatozoides, a los 60 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), a distinta concentración de zinc (Zn) o su quelante TPEN (T). Todas las concentraciones están indicadas en µM. Los niveles de significación se indican mediante letras.

10ZnCo10T: Co-incubación con 10 µM de zinc y 10 µM de TPEN.

50ZnCo50T: Co-incubación con 50 µM de zinc y 50 µM de TPEN.

10TPost10Zn: Adición de 10 µM de zinc tras 10 min de incubación con 10 µM de TPEN.

50TPost50Zn: Adición de 50 µM de zinc tras 10 min de incubación con 50 µM de TPEN.

**Tabla S4.4:** Porcentaje de agrupaciones espermáticas

		% Trenes	% Agrupaciones no progresivas
<b>NC</b>	Control	66,75 <sup>b</sup> ± 2,846	19,52 <sup>b</sup> ± 2,259
	10Zn	68,82 <sup>b</sup> ± 7,303	19,35 <sup>b</sup> ± 7,118
	50Zn	60,61 <sup>b</sup> ± 9,892	15,14 <sup>ab</sup> ± 8,116
	100T	65,50 <sup>b</sup> ± 0,098	15,87 <sup>b</sup> ± 2,748
	10ZnCo10T	67,31 <sup>b</sup> ± 14,132	10,10 <sup>a</sup> ± 1,963
	50ZnCo50T	40,75 <sup>a</sup> ± 2,654	36,75 <sup>c</sup> ± 0,612
	10Tpost10Zn	84,31 <sup>c</sup> ± 7,260	12,36 <sup>ab</sup> ± 5,917
	50Tpost50Zn	34,52 <sup>a</sup> ± 10,692	17,86 <sup>ab</sup> ± 8,748
<b>CAP</b>	Control	31,04 <sup>c</sup> ± 0,824	42,13 <sup>b</sup> ± 1,397
	10Zn	31,19 <sup>c</sup> ± 3,252	55,72 <sup>c</sup> ± 7,382
	50Zn	34,26 <sup>c</sup> ± 9,118	52,63 <sup>c</sup> ± 6,743
	100T	31,93 <sup>c</sup> ± 15,740	27,99 <sup>a</sup> ± 6,910
	10ZnCo10T	27,90 <sup>bc</sup> ± 9,171	67,75 <sup>d</sup> ± 12,721
	50ZnCo50T	12,50 <sup>ab</sup> ± 10,206	37,50 <sup>ab</sup> ± 10,206
	10Tpost10Zn	6,98 <sup>a</sup> ± 2,801	63,73 <sup>cd</sup> ± 3,345
	50Tpost50Zn	25,00 <sup>c</sup> ± 0,000	70,83 <sup>d</sup> ± 3,402

Promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, en el porcentaje de agrupaciones móviles (*trenes*) o no progresivas, del total de agrupaciones formadas (se excluyen agrupaciones de espermatozoides inmóviles). Analizado a los 60 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), a distinta concentración de zinc (Zn) o su quelante TPEN (T). Todas las concentraciones están indicadas en µM. Los niveles de significación, de cada medio de cultivo y tipo de agrupación, se indican mediante letras. 10ZnCo10T: Co-incubación con 10 µM de zinc y 10 µM de TPEN.

50ZnCo50T: Co-incubación con 50 µM de zinc y 50 µM de TPEN.

10TPost10Zn: Adición de 10 µM de zinc tras 10 min de incubación con 10 µM de TPEN.

50TPost50Zn: Adición de 50 µM de zinc tras 10 min de incubación con 50 µM de TPEN.

Tabla S4.5 Porcentaje de cada clase espermática

		CONTROL	10Zn	50Zn	10ZnCo10T	50ZnCo50T	10Tpost10Zn	50Tpost50Zn	ETANOL	
Espermatozoides progresivos	NC	15	64,18 <sup>ab</sup> ± 6,785	62,57 <sup>ab</sup> ± 5,482	68,61 <sup>ab</sup> ± 5,951	82,88 <sup>bc</sup> ± 11,121	55,56 <sup>ab</sup> ± 11,121	-- ± --	-- ± --	
		30	51,34 <sup>a</sup> ± 8,087	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		60	73,57 <sup>b</sup> ± 5,333	82,51 <sup>b</sup> ± 6,924	84,05 <sup>b</sup> ± 8,177	69,45 <sup>b</sup> ± 8,087	63,91 <sup>b</sup> ± 8,088	64,11 <sup>b</sup> ± 6,047	63,37 <sup>b</sup> ± 6,786	-- ± --
	CAP	15	74,08 <sup>b</sup> ± 8,088	78,56 <sup>b</sup> ± 6,817	68,29 <sup>b</sup> ± 8,088	-- ± --	76,32 <sup>b</sup> ± 11,121	80,35 <sup>bc</sup> ± 11,121	-- ± --	-- ± --
		30	78,49 <sup>b</sup> ± 6,022	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	54,11 <sup>a</sup> ± 5,333	76,65 <sup>b</sup> ± 6,907	81,88 <sup>bc</sup> ± 6,174	84,19 <sup>bc</sup> ± 8,087	92,86 <sup>c</sup> ± 11,121	76,48 <sup>b</sup> ± 6,047	92,48 <sup>c</sup> ± 8,078	54,47 <sup>a</sup> ± 11,121
Espermatozoides intermedios	NC	15	13,23 <sup>c</sup> ± 2,994	10,70 <sup>c</sup> ± 2,319	9,18 <sup>c</sup> ± 2,593	4,11 <sup>a</sup> ± 5,185	11,11 <sup>bc</sup> ± 5,185	-- ± --	-- ± --	
		30	17,65 <sup>c</sup> ± 3,666	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		60	11,16 <sup>c</sup> ± 2,117	5,04 <sup>a</sup> ± 2,994	4,43 <sup>a</sup> ± 3,666	11,79 <sup>c</sup> ± 3,666	4,00 <sup>a</sup> ± 3,666	14,40 <sup>c</sup> ± 2,593	10,88 <sup>c</sup> ± 2,994	-- ± --
	CAP	15	6,65 <sup>ab</sup> ± 3,666	4,89 <sup>ab</sup> ± 2,994	5,23 <sup>ab</sup> ± 3,666	-- ± --	5,26 <sup>ab</sup> ± 5,185	3,47 <sup>a</sup> ± 5,185	-- ± --	-- ± --
		30	5,00 <sup>ab</sup> ± 2,504	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	6,78 <sup>b</sup> ± 2,117	7,44 <sup>b</sup> ± 2,994	3,79 <sup>a</sup> ± 2,593	3,40 <sup>a</sup> ± 3,666	5,18 <sup>ab</sup> ± 0,852	5,18 <sup>ab</sup> ± 2,593	3,67 <sup>a</sup> ± 0,626	18,43 <sup>c</sup> ± 5,185
Espermatozoides hiperactivos	NC	15	22,59 <sup>b</sup> ± 4,629	26,73 <sup>b</sup> ± 3,786	22,21 <sup>b</sup> ± 4,074	13,01 <sup>b</sup> ± 7,461	33,33 <sup>c</sup> ± 7,461	-- ± --	-- ± --	
		30	31,02 <sup>c</sup> ± 5,472	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		60	15,27 <sup>b</sup> ± 3,826	12,45 <sup>ab</sup> ± 4,811	11,53 <sup>b</sup> ± 5,592	18,75 <sup>b</sup> ± 5,472	32,09 <sup>c</sup> ± 5,474	21,49 <sup>b</sup> ± 4,164	25,75 <sup>b</sup> ± 4,631	-- ± --
	CAP	15	19,27 <sup>b</sup> ± 5,474	16,56 <sup>b</sup> ± 4,667	26,48 <sup>b</sup> ± 5,474	-- ± --	18,42 <sup>b</sup> ± 7,461	16,18 <sup>b</sup> ± 7,461	-- ± --	-- ± --
		30	16,52 <sup>b</sup> ± 4,238	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	39,12 <sup>c</sup> ± 6,000	15,91 <sup>b</sup> ± 4,796	14,33 <sup>b</sup> ± 4,346	12,41 <sup>b</sup> ± 5,472	7,14 <sup>a</sup> ± 7,461	18,33 <sup>ab</sup> ± 4,164	7,52 <sup>a</sup> ± 5,462	27,10 <sup>bc</sup> ± 7,461

Promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, en el porcentaje de cada clase de espermatozoides vigorosos en los espermatozoides agrupados, tras 60 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), a distinta concentración de zinc (Zn) o su quelante TPEN (T). Todas las concentraciones están indicadas en µM.

Los niveles de significación, de cada clase espermática, se indican mediante letras.

10ZnCo10T: Co-incubación con 10 µM de zinc y 10 µM de TPEN. 50ZnCo50T: Co-incubación con 50 µM de zinc y 50 µM de TPEN.

10TPost10Zn: Adición de 10 µM de zinc tras 10 min de incubación con 10 µM de TPEN.

50TPost50Zn: Adición de 50 µM de zinc tras 10 min de incubación con 50 µM de TPEN.

**Tabla S4.6** Intensidad relativa de la señal de pPKA y pY

	Muestra	NC		CAP	
pPKA	Control	35,37 <sup>b</sup>	± 5,620	82,73 <sup>e</sup>	± 5,620
	1Zn	101,19 <sup>f</sup>	± 6,485	81,25 <sup>de</sup>	± 6,940
	10Zn	95,38 <sup>f</sup>	± 6,485	88,57 <sup>ef</sup>	± 6,485
	50Zn	70,75 <sup>cd</sup>	± 6,940	114,75 <sup>g</sup>	± 6,940
	100Zn	69,25 <sup>cd</sup>	± 6,940	91,00 <sup>f</sup>	± 6,485
	500Zn	--	± --	89,62 <sup>ef</sup>	± 6,485
	0,5 T	67,49 <sup>cd</sup>	± 6,485	115,99 <sup>g</sup>	± 6,485
	50 T	28,38 <sup>b</sup>	± 6,485	138,29 <sup>h</sup>	± 6,485
	50ZnCoT	65,48 <sup>cd</sup>	± 6,485	62,20 <sup>cd</sup>	± 6,485
	0,75 ZnCoT	151,00 <sup>g</sup>	± 6,485	--	± --
	1000 T	57,35 <sup>c</sup>	± 6,485	148,54 <sup>hg</sup>	± 6,485
	1000 T Co 10Zn	59,50 <sup>c</sup>	± 6,940	11,25 <sup>a</sup>	± 6,940
	1,5 Zn Co T	145,00 <sup>hg</sup>	± 6,940	81,25 <sup>ef</sup>	± 6,940
	10 Zn Co T	72,90 <sup>d</sup>	± 6,485	63,12 <sup>cd</sup>	± 6,485
	10Zn post T	90,65 <sup>f</sup>	± 6,485	75,93 <sup>d</sup>	± 6,485
	50Zn post T	65,25 <sup>cd</sup>	± 6,940	65,16 <sup>cd</sup>	± 6,940
pY	Control	33,25 <sup>ab</sup>	± 5,620	103,99 <sup>g</sup>	± 5,620
	1Zn	53,88 <sup>bc</sup>	± 6,485	81,12 <sup>ef</sup>	± 6,940
	10Zn	90,74 <sup>f</sup>	± 6,485	86,32 <sup>f</sup>	± 6,485
	50Zn	67,54 <sup>d</sup>	± 6,940	130,91 <sup>i</sup>	± 6,940
	100Zn	83,47 <sup>f</sup>	± 6,940	96,15 <sup>fg</sup>	± 6,485
	500Zn	--	± --	81,42 <sup>ef</sup>	± 6,485
	0,5 T	26,91 <sup>a</sup>	± 6,485	97,79 <sup>fg</sup>	± 6,485
	50 T	64,50 <sup>d</sup>	± 6,485	95,67 <sup>fg</sup>	± 6,485
	50ZnCoT	54,21 <sup>c</sup>	± 6,485	134,57 <sup>i</sup>	± 6,485
	0,75 ZnCoT	106,74 <sup>g</sup>	± 6,485	109,81 <sup>g</sup>	± 6,485
	1000 T	25,85 <sup>a</sup>	± 6,485	94,95 <sup>f</sup>	± 6,485
	1000 T Co 10Zn	27,27 <sup>a</sup>	± 6,940	109,04 <sup>g</sup>	± 6,940
	1,5 Zn Co T	72,97 <sup>df</sup>	± 6,940	95,53 <sup>fg</sup>	± 6,940
	10 Zn Co T	85,00 <sup>f</sup>	± 6,485	81,67 <sup>ef</sup>	± 6,485
	10Zn post T	43,66 <sup>bc</sup>	± 6,485	135,55 <sup>i</sup>	± 6,485
	50Zn post T	41,07 <sup>b</sup>	± 6,940	122,92 <sup>h</sup>	± 6,940

Promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, en la intensidad relativa de la señal de pPKA y pY, tras 60 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), a distinta concentración de zinc (Zn) o su quelante TPEN (T).

Todas las concentraciones están indicadas en µM.

Los niveles de significación, de cada tipo de proteínas, se indican mediante letras.

10ZnCo10T: Co-incubación con 10 µM de zinc y 10 µM de TPEN. 50ZnCo50T: Co-incubación con 50 µM de zinc y 50 µM de TPEN.

10TPost10Zn: Adición de 10 µM de zinc tras 10 min de incubación con 10 µM de TPEN.

50TPost50Zn: Adición de 50 µM de zinc tras 10 min de incubación con 50 µM de TPEN.

Tabla S4.7. Parámetros de velocidad espermática

VAP	Tiempo (min)	CONTROL	10Zn	50Zn	10T	50T	10ZnCo10T	50ZnCo50T	10Tpost10Zn	50Tpost50Zn	
Espermatozoides progresivos	15	83,87 ± 26,777	79,98 ± 21,834	64,03 ± 17,483	-- ± --	-- ± --	54,83 ± 18,514	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	NC	30	58,93 ± 17,463	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	76,78 ± 25,129	75,61 ± 21,118	63,41 ± 15,566	-- ± --	-- ± --	70,61 ± 22,132	59,07 ± 19,543	71,12 ± 19,923	67,90 ± 21,776
	CAP	15	69,64 ± 29,143	62,05 ± 19,485	70,28 ± 16,415	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	65,87 ± 16,010	-- ± --
		60	60,99 ± 18,370	74,05 ± 24,464	63,88 ± 19,795	59,69 ± 17,720	60,33 ± 18,296	68,19 ± 17,316	-- ± --	73,73 ± 20,888	69,49 ± 14,006
	Espermatozoides intermedios	15	96,14 ± 15,693	84,13 ± 13,811	77,97 ± 12,151	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
NC		30	78,30 ± 9,850	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	97,60 ± 19,041	93,06 ± 13,559	74,95 ± 8,809	-- ± --	-- ± --	82,18 ± 10,604	77,31 ± 13,005	86,23 ± 15,220	102,28 ± 21,073
CAP		15	98,41 ± 19,397	85,52 ± 8,128	87,98 ± 13,591	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	88,44 ± 14,978	-- ± --
		60	83,13 ± 12,456	94,40 ± 12,368	99,28 ± 14,548	75,20 ± 11,281	91,36 ± 12,274	91,95 ± 12,120	-- ± --	90,16 ± 18,763	-- ± --
Espermatozoides hiperactivos		15	84,61 ± 18,657	75,13 ± 15,170	70,08 ± 15,170	-- ± --	-- ± --	58,93 ± 11,367	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	NC	30	74,06 ± 7,093	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	81,37 ± 19,286	72,85 ± 14,758	62,78 ± 12,899	-- ± --	-- ± --	73,56 ± 12,592	63,47 ± 13,171	82,09 ± 16,391	80,60 ± 20,223
	CAP	15	79,79 ± 24,273	78,25 ± 19,196	79,45 ± 15,474	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	72,55 ± 14,183	-- ± --
		60	81,92 ± 18,820	86,89 ± 21,363	74,95 ± 17,138	72,92 ± 7,401	82,82 ± 19,298	78,08 ± 15,447	-- ± --	82,50 ± 16,780	62,90 ± 13,829

Tabla S4.7Cont. Parámetros de velocidad espermática

VSL	Tiempo (min)	CONTROL	10Zn	50Zn	10T	50T	10ZnCo10T	50ZnCo50T	10Tpost10Zn	50Tpost50Zn	
Espermatozoides progresivos	15	70,44 ± 27,566	65,19 ± 23,123	46,74 ± 17,731	-- ± --	-- ± --	39,12 ± 18,025	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	NC	30	41,40 ± 16,855	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	60	61,38 ± 26,551	60,50 ± 22,599	47,13 ± 15,671	-- ± --	-- ± --	53,91 ± 22,435	42,48 ± 20,231	55,39 ± 20,437	47,13 ± 22,165	
	CAP	15	48,09 ± 26,052	38,87 ± 17,902	50,15 ± 13,922	-- ± --	-- ± --	-- ± --	± --	42,72 ± 12,673	-- ± --
	60	39,15 ± 14,992	49,15 ± 21,559	43,39 ± 16,526	40,93 ± 17,021	36,08 ± 14,543	42,95 ± 14,243	± --	51,89 ± 21,059	39,33 ± 10,435	
	Espermatozoides intermedios	15	75,22 ± 15,138	64,85 ± 11,868	55,93 ± 12,093	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
NC		30	60,14 ± 7,247	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
60		76,43 ± 17,263	69,90 ± 12,137	53,84 ± 6,774	-- ± --	-- ± --	64,71 ± 11,226	60,65 ± 13,981	65,47 ± 14,637	72,84 ± 17,902	
CAP		15	62,12 ± 8,682	63,75 ± 8,961	62,77 ± 10,327	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	46,88 ± 5,954	-- ± --
60		56,78 ± 11,251	62,06 ± 14,726	55,88 ± 9,350	48,88 ± 4,520	56,43 ± 11,252	59,26 ± 6,556	-- ± --	62,46 ± 13,636	-- ± --	
Espermatozoides hiperactivos		15	54,84 ± 14,021	43,00 ± 9,621	42,62 ± 12,553	-- ± --	-- ± --	32,14 ± 6,605	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	NC	30	48,46 ± 8,374	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	60	50,31 ± 14,514	42,81 ± 11,538	31,75 ± 7,768	-- ± --	-- ± --	43,98 ± 11,354	34,79 ± 8,957	48,10 ± 11,623	44,53 ± 14,572	
	CAP	15	36,86 ± 13,509	38,79 ± 12,259	40,47 ± 10,178	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	32,09 ± 9,782	-- ± --
	60	38,18 ± 9,688	36,91 ± 12,159	35,02 ± 11,388	35,33 ± 12,773	39,46 ± 11,718	33,74 ± 7,960	-- ± --	41,44 ± 13,399	22,14 ± --	

Tabla S4.7Cont. Parámetros de velocidad espermática

VCL	Tiempo (min)	CONTROL	10Zn	50Zn	10T	50T	10ZnCo10T	50ZnCo50T	10Tpost10Zn	50Tpost50Zn	
Espermatozoides progresivos	15	190,25 ± 59,359	188,78 ± 43,277	151,47 ± 43,403	-- ± --	-- ± --	132,43 ± 51,500	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	NC	30	143,17 ± 45,493	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	168,13 ± 55,153	165,16 ± 47,382	138,27 ± 40,409	-- ± --	-- ± --	164,19 ± 51,230	142,45 ± 50,261	167,69 ± 53,519	154,72 ± 49,328
	CAP	15	137,31 ± 43,661	133,35 ± 37,688	152,98 ± 34,505	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	134,37 ± 35,987	±
		60	125,82 ± 38,079	144,09 ± 47,101	126,55 ± 42,916	129,45 ± 43,350	119,76 ± 38,631	128,53 ± 29,993	-- ± --	156,42 ± 49,071	137,46 ± 19,626
	Espermatozoides intermedios	15	258,32 ± 36,687	233,84 ± 25,210	215,30 ± 28,711	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
NC		30	222,14 ± 16,932	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	253,15 ± 31,338	239,00 ± 25,831	205,81 ± 11,726	-- ± --	-- ± --	228,00 ± 18,164	219,23 ± 24,930	233,62 ± 31,319	246,87 ± 37,692
CAP		15	218,63 ± 18,114	227,76 ± 16,790	219,74 ± 23,547	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	185,59 ± 13,916	-- ± --
		60	209,75 ± 18,587	218,20 ± 28,379	203,49 ± 14,434	192,00 ± 6,532	204,16 ± 24,011	215,45 ± 14,376	-- ± --	225,22 ± 28,281	-- ± --
Espermatozoides hiperactivos		15	251,31 ± 40,809	215,45 ± 27,977	208,67 ± 42,274	-- ± --	-- ± --	178,04 ± 30,727	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	NC	30	226,23 ± 20,526	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	238,26 ± 54,558	210,89 ± 37,685	169,69 ± 23,702	-- ± --	-- ± --	216,87 ± 31,396	184,98 ± 29,861	231,54 ± 33,399	212,69 ± 43,612
	CAP	15	191,36 ± 47,779	193,70 ± 33,555	198,97 ± 36,410	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	175,41 ± 41,699	-- ± --
		60	193,33 ± 35,109	184,30 ± 37,391	183,80 ± 47,446	175,61 ± 40,700	192,61 ± 36,143	172,93 ± 29,381	-- ± --	203,85 ± 41,100	132,05 ± 41,235

Valor promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación de los parámetros de la velocidad espermática, tras 60 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), a distinta concentración de zinc (Zn) o su quelante TPEN (T).

Todas las concentraciones están indicadas en µM.

10ZnCo10T: Co-incubación con 10 µM de zinc y 10 µM de TPEN. 50ZnCo50T: Co-incubación con 50 µM de zinc y 50 µM de TPEN.

10TPost10Zn: Adición de 10 µM de zinc tras 10 min de incubación con 10 µM de TPEN.

50TPost50Zn: Adición de 50 µM de zinc tras 10 min de incubación con 50 µM de TPEN.

Tabla S4.8. Parámetros de trayectoria espermática

ALH	Tiempo (min)	CONTROL	10Zn	50Zn	10T	50T	10ZnCo10T	50ZnCo50T	10Tpost10Zn	50Tpost50Zn		
Espermatozoides progresivos	NC	15	6,84 ± 1,906	7,24 ± 1,594	6,80 ± 2,030	-- ± --	-- ± --	6,03 ± 2,266	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		30	6,28 ± 2,150	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		60	6,58 ± 1,969	6,27 ± 1,661	6,32 ± 2,082	-- ± --	-- ± --	6,39 ± 1,743	6,64 ± 1,920	6,55 ± 2,024	6,98 ± 1,818	
	CAP	15	6,00 ± 2,160	6,26 ± 1,857	6,77 ± 1,960	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	6,42 ± 1,913	-- ± --	
		60	6,07 ± 1,868	6,51 ± 2,041	5,86 ± 2,082	6,46 ± 2,180	6,06 ± 2,170	6,26 ± 1,700	-- ± --	6,60 ± 1,941	6,60 ± 1,390	
		15	8,79 ± 1,126	8,68 ± 0,909	9,60 ± 0,987	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
Espermatozoides intermedios	NC	30	9,86 ± 1,009	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		60	9,06 ± 1,155	8,76 ± 1,633	9,71 ± 0,854	-- ± --	-- ± --	8,49 ± 1,143	9,07 ± 0,891	8,61 ± 1,150	11,66 ± 2,722	
		15	9,58 ± 0,997	10,33 ± 1,371	9,67 ± 1,285	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	8,42 ± 1,404	-- ± --	
	CAP	60	10,23 ± 1,536	10,07 ± 1,715	9,88 ± 1,940	10,16 ± 0,890	10,92 ± 1,240	7,62 ± 1,148	-- ± --	7,99 ± 1,461	-- ± --	
		NC	15	8,80 ± 1,251	8,25 ± 1,118	8,87 ± 1,727	-- ± --	-- ± --	7,90 ± 1,596	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			30	9,80 ± 1,291	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
60	8,84 ± 1,866		8,08 ± 1,292	8,24 ± 0,916	-- ± --	-- ± --	8,24 ± 1,410	8,32 ± 1,448	8,31 ± 1,455	9,51 ± 1,956		
CAP	15	8,55 ± 2,331	9,45 ± 1,978	8,91 ± 2,083	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	7,53 ± 1,797	-- ± --		
	60	9,10 ± 2,245	8,48 ± 1,925	7,68 ± 2,017	8,84 ± 1,784	9,91 ± 2,497	7,51 ± 1,340	-- ± --	7,97 ± 1,536	6,55 ± 1,852		



Tabla S4.8 cont. Parámetros de trayectoria espermática

BCF	Tiempo (min)	CONTROL	10Zn	50Zn	10T	50T	10ZnCo10T	50ZnCo50T	10Tpost10Zn	50Tpost50Zn	
Espermatozoides progresivos	NC	15	24,58 ± 7,039	21,58 ± 6,200	17,79 ± 5,352	-- ± --	-- ± --	16,04 ± 5,724	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	18,35 ± 4,594	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	20,25 ± 6,233	21,13 ± 5,456	18,29 ± 5,533	-- ± --	-- ± --	20,35 ± 7,216	18,75 ± 6,298	21,62 ± 5,446	16,67 ± 5,379
	CAP	15	17,04 ± 6,186	17,35 ± 6,461	16,63 ± 5,319	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	16,13 ± 4,743	-- ± --
		60	16,79 ± 4,754	16,49 ± 5,491	17,09 ± 5,245	14,90 ± 4,618	15,88 ± 4,753	16,72 ± 4,432	-- ± --	18,65 ± 5,761	15,31 ± 3,173
		15	21,61 ± 4,634	20,33 ± 5,391	13,63 ± 3,535	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
Espermatozoides intermedios	NC	30	14,18 ± 2,334	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	19,07 ± 4,723	19,58 ± 6,082	12,90 ± 3,033	-- ± --	-- ± --	21,46 ± 5,146	19,95 ± 4,554	20,25 ± 4,812	14,18 ± 5,194
		15	14,73 ± 6,130	13,60 ± 2,140	12,20 ± 4,085	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	13,09 ± 3,371	-- ± --
	CAP	60	12,09 ± 2,928	13,81 ± 3,845	9,40 ± 2,857	10,03 ± 1,457	10,97 ± 2,875	17,09 ± 4,180	-- ± --	21,18 ± 7,195	-- ± --
		15	20,08 ± 5,089	18,94 ± 5,269	16,04 ± 4,670	-- ± --	-- ± --	16,83 ± 3,401	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	13,94 ± 4,729	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
Espermatozoides hiperactivos	NC	60	18,80 ± 4,425	18,81 ± 5,808	14,97 ± 4,808	-- ± --	-- ± --	18,57 ± 5,578	19,02 ± 5,812	20,00 ± 6,155	14,93 ± 4,891
		15	13,47 ± 5,805	13,61 ± 4,053	14,30 ± 4,044	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	15,12 ± 3,308	-- ± --
		60	14,14 ± 4,068	15,41 ± 4,791	19,56 ± 8,444	12,16 ± 2,970	12,11 ± 3,191	16,96 ± 4,636	-- ± --	19,84 ± 6,822	11,33 ± 0,265

Tabla S4.8 Cont. Parámetros de trayectoria espermática

STR	Tiempo (min)	CONTROL	10Zn	50Zn	10T	50T	10ZnCo10T	50ZnCo50T	10Tpost10Zn	50Tpost50Zn	
Espermatozoides progresivos	NC	15	81,51 ± 11,299	79,64 ± 11,008	71,33 ± 12,053	-- ± --	-- ± --	68,84 ± 11,012	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	68,83 ± 11,245	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	77,42 ± 12,053	77,89 ± 11,400	73,21 ± 11,253	-- ± --	-- ± --	74,10 ± 12,863	69,44 ± 13,576	75,98 ± 12,412	67,24 ± 14,529
	CAP	15	66,91 ± 15,106	61,96 ± 14,756	71,25 ± 9,590	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	65,18 ± 12,235	-- ± --
		60	63,66 ± 12,372	65,33 ± 14,633	67,31 ± 13,031	66,83 ± 13,898	59,30 ± 12,690	62,63 ± 12,154	-- ± --	69,10 ± 15,187	56,26 ± 8,581
		60	63,66 ± 12,372	65,33 ± 14,633	67,31 ± 13,031	66,83 ± 13,898	59,30 ± 12,690	62,63 ± 12,154	-- ± --	69,10 ± 15,187	56,26 ± 8,581
Espermatozoides intermedios	NC	15	78,05 ± 7,719	77,15 ± 6,800	71,52 ± 8,224	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	76,99 ± 4,986	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	78,14 ± 7,098	75,05 ± 6,613	72,04 ± 6,134	-- ± --	-- ± --	78,69 ± 7,755	77,89 ± 6,707	75,68 ± 8,218	70,86 ± 7,175
	CAP	15	64,55 ± 11,147	74,35 ± 4,801	71,66 ± 9,016	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	54,57 ± 13,740	-- ± --
		60	68,31 ± 8,009	65,74 ± 12,693	56,77 ± 9,560	65,55 ± 6,242	61,66 ± 8,175	65,09 ± 8,746	-- ± --	69,98 ± 11,003	-- ± --
		60	68,31 ± 8,009	65,74 ± 12,693	56,77 ± 9,560	65,55 ± 6,242	61,66 ± 8,175	65,09 ± 8,746	-- ± --	69,98 ± 11,003	-- ± --
Espermatozoides hiperactivos	NC	15	64,95 ± 10,421	58,24 ± 11,564	60,49 ± 9,851	-- ± --	-- ± --	55,02 ± 9,015	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	65,55 ± 9,812	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	61,63 ± 9,580	58,56 ± 10,144	51,01 ± 9,884	-- ± --	-- ± --	59,65 ± 10,549	55,00 ± 9,243	59,11 ± 11,109	55,02 ± 10,423
	CAP	15	46,64 ± 10,714	50,06 ± 11,223	51,54 ± 11,161	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	44,58 ± 10,770	-- ± --
		60	47,63 ± 10,995	43,25 ± 11,332	48,07 ± 15,315	48,38 ± 16,471	47,84 ± 9,708	43,97 ± 10,822	-- ± --	50,48 ± 13,058	35,20 ± 0,159
		60	47,63 ± 10,995	43,25 ± 11,332	48,07 ± 15,315	48,38 ± 16,471	47,84 ± 9,708	43,97 ± 10,822	-- ± --	50,48 ± 13,058	35,20 ± 0,159

Tabla S4.8 Cont. Parámetros de trayectoria espermática

LIN	Tiempo (min)	CONTROL	10Zn	50Zn	10T	50T	10ZnCo10T	50ZnCo50T	10Tpost10Zn	50Tpost50Zn	
Espermatozoides progresivos	NC	15	36,68 ± 8,705	34,09 ± 8,453	31,00 ± 8,227	-- ± --	-- ± --	31,03 ± 13,077	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	29,35 ± 8,425	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	36,36 ± 9,734	36,74 ± 9,963	35,48 ± 11,543	-- ± --	-- ± --	32,63 ± 8,664	29,75 ± 8,440	33,53 ± 9,219	30,01 ± 8,790
	CAP	15	34,62 ± 14,396	28,95 ± 8,543	33,47 ± 8,534	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	32,96 ± 9,616	-- ± --
		60	31,58 ± 9,560	34,03 ± 9,613	35,05 ± 10,419	31,51 ± 8,237	30,27 ± 7,621	33,54 ± 8,976	-- ± --	33,37 ± 9,450	28,43 ± 6,127
Espermatozoides intermedios	NC	15	28,92 ± 2,315	27,56 ± 2,453	25,77 ± 2,377	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	27,01 ± 1,891	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	29,90 ± 3,434	29,10 ± 2,847	26,08 ± 2,154	-- ± --	-- ± --	28,20 ± 2,681	27,37 ± 3,316	27,75 ± 2,730	29,12 ± 3,397
	CAP	15	28,33 ± 2,123	27,90 ± 2,208	28,42 ± 2,414	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	25,19 ± 1,618	-- ± --
		60	26,87 ± 3,053	28,09 ± 3,391	27,36 ± 3,119	25,43 ± 1,769	27,42 ± 2,421	27,46 ± 1,636	-- ± --	27,47 ± 2,898	-- ± --
Espermatozoides hiperactivos	NC	15	21,61 ± 3,359	19,86 ± 2,871	20,15 ± 2,565	-- ± --	-- ± --	18,01 ± 1,496	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	21,35 ± 2,523	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	20,93 ± 2,708	20,06 ± 2,991	18,52 ± 2,340	-- ± --	-- ± --	20,10 ± 3,234	18,62 ± 2,552	20,65 ± 3,259	20,55 ± 3,291
	CAP	15	18,90 ± 2,968	19,70 ± 3,212	20,22 ± 2,572	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	18,17 ± 2,488	-- ± --
		60	19,62 ± 2,704	19,68 ± 2,889	18,93 ± 2,378	19,66 ± 3,246	20,15 ± 2,958	19,37 ± 1,999	-- ± --	19,98 ± 3,165	16,76 ± #iDIV/0!

Tabla S4.8 Cont. Parámetros de trayectoria espermática

WOB	Tiempo (min)	CONTROL	10Zn	50Zn	10T	50T	10ZnCo10T	50ZnCo50T	10Tpost10Zn	50Tpost50Zn	
Espermatozoides progresivos	NC	15	44,93 ± 8,602	42,62 ± 7,380	43,36 ± 7,891	-- ± --	-- ± --	44,77 ± 14,410	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	42,55 ± 9,308	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	46,87 ± 9,553	46,84 ± 9,200	47,75 ± 10,596	-- ± --	-- ± --	44,23 ± 9,764	43,04 ± 8,937	44,32 ± 9,891	44,78 ± 8,276
	CAP	15	51,16 ± 14,422	47,10 ± 8,983	46,97 ± 9,558	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	50,45 ± 9,713	-- ± --
		60	49,55 ± 9,678	52,33 ± 9,223	52,07 ± 10,641	47,49 ± 8,408	51,59 ± 9,189	53,39 ± 7,797	-- ± --	48,74 ± 9,797	50,20 ± 4,760
		60	37,28 ± 3,488	35,89 ± 3,532	36,34 ± 4,555	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
Espermatozoides intermedios	NC	15	37,28 ± 3,488	35,89 ± 3,532	36,34 ± 4,555	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	35,19 ± 3,010	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	38,42 ± 4,440	38,91 ± 3,878	36,38 ± 3,573	-- ± --	-- ± --	35,99 ± 3,126	35,15 ± 3,219	36,87 ± 3,608	41,22 ± 3,870
	CAP	15	45,28 ± 10,092	37,50 ± 0,815	40,08 ± 4,537	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	48,12 ± 10,339	-- ± --
		60	39,63 ± 4,501	43,73 ± 6,667	48,93 ± 7,531	39,15 ± 5,511	44,81 ± 3,668	42,72 ± 5,468	-- ± --	40,02 ± 6,621	-- ± --
		60	33,64 ± 4,822	34,93 ± 5,874	33,81 ± 4,801	-- ± --	-- ± --	33,11 ± 3,091	-- ± --	-- ± --	-- ± --
Espermatozoides hiperactivos	NC	15	33,64 ± 4,822	34,93 ± 5,874	33,81 ± 4,801	-- ± --	-- ± --	33,11 ± 3,091	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	32,88 ± 3,252	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	34,40 ± 4,748	34,80 ± 5,299	37,14 ± 6,551	-- ± --	-- ± --	33,97 ± 3,736	34,31 ± 4,423	35,52 ± 5,054	37,90 ± 5,155
	CAP	15	41,78 ± 7,680	40,34 ± 7,102	40,38 ± 6,950	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	43,14 ± 12,333	-- ± --
		60	42,66 ± 7,989	47,40 ± 9,283	42,52 ± 11,460	43,32 ± 10,480	43,24 ± 7,555	45,67 ± 7,939	-- ± --	41,34 ± 8,515	47,63 ± 3,279
		60	42,66 ± 7,989	47,40 ± 9,283	42,52 ± 11,460	43,32 ± 10,480	43,24 ± 7,555	45,67 ± 7,939	-- ± --	41,34 ± 8,515	47,63 ± 3,279

Promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación de los parámetros de la trayectoria espermática, tras 60 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), a distinta concentración de zinc (Zn) o su quelante TPEN (T).

Todas las concentraciones están indicadas en µM.

10ZnCo10T: Co-incubación con 10 µM de zinc y 10 µM de TPEN. 50ZnCo50T: Co-incubación con 50 µM de zinc y 50 µM de TPEN.

10TPost10Zn: Adición de 10 µM de zinc tras 10 min de incubación con 10 µM de TPEN.

50TPost50Zn: Adición de 50 µM de zinc tras 10 min de incubación con 50 µM de TPEN.

**Tabla S4.9:** Variación de los componentes principales de la velocidad.

OSV 1	Tiempo (min)	CONTROL	10Zn	50Zn	10T	50T	10ZnCo10T	50ZnCo50T	10Tpost10Zn	50Tpost50Zn	
Espermatozoides progresivos	NC	15	0,26 ± 0,086	0,09 ± 0,066	0,53 ± 0,116	-- ± --	-- ± --	0,20 ± 0,193	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	0,01 ± 0,095	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	0,13 ± 0,055	-0,08 ± 0,058	-0,06 ± 0,069	-- ± --	-- ± --	-0,18 ± 0,104	-0,31 ± 0,127	-0,32 ± 0,071	0,61 ± 0,091
	CAP	15	0,61 ± 0,150	0,17 ± 0,116	0,48 ± 0,078	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-0,03 ± 0,100	-- ± --
		60	-0,25 ± 0,061	0,90 ± 0,070	-0,42 ± 0,067	0,36 ± 0,064	-0,78 ± 0,073	0,27 ± 0,076	-- ± --	0,33 ± 0,074	-0,10 ± 0,301
		15	0,57 ± 0,121	-0,15 ± 0,122	0,49 ± 0,238	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
Espermatozoides intermedios	NC	30	-0,10 ± 0,151	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	-0,25 ± 0,138	-0,26 ± 0,193	0,19 ± 0,267	-- ± --	-- ± --	-0,23 ± 0,192	-0,79 ± 0,310	-0,30 ± 0,140	0,47 ± 0,155
		15	0,57 ± 0,361	0,00 ± 0,396	0,68 ± 0,205	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	0,12 ± 0,392	-- ± --
	CAP	60	-0,40 ± 0,217	1,03 ± 0,174	-0,72 ± 0,374	0,22 ± 0,446	-0,80 ± 0,258	0,84 ± 0,395	-- ± --	0,42 ± 0,201	-- ± --
		15	0,62 ± 0,107	0,12 ± 0,090	0,47 ± 0,154	-- ± --	-- ± --	-0,10 ± 0,455	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	-0,03 ± 0,119	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
Espermatozoides hiperactivos	NC	15	0,06 ± 0,117	-0,35 ± 0,175	-0,12 ± 0,225	-- ± --	-- ± --	-0,29 ± 0,164	-0,48 ± 0,155	-0,29 ± 0,114	0,45 ± 0,119
		30	0,80 ± 0,237	0,22 ± 0,217	0,56 ± 0,168	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-0,02 ± 0,221	-- ± --
		60	-0,37 ± 0,148	0,72 ± 0,158	-0,56 ± 0,152	0,13 ± 0,413	-0,51 ± 0,155	0,03 ± 0,218	-- ± --	0,34 ± 0,138	0,28 ± 0,910

**Tabla S4.9 Cont.:** Variación de los componentes principales de la velocidad.

OSV 2	Tiempo (min)	CONTROL	10Zn	50Zn	10T	50T	10ZnCo10T	50ZnCo50T	10Tpost10Zn	50Tpost50Zn	
Espermatozoides progresivos	NC	15	-0,49 ± 0,065	-0,11 ± 0,050	-0,42 ± 0,087	-- ± --	-- ± --	-0,03 ± 0,145	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	0,60 ± 0,072	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	-0,67 ± 0,041	-0,39 ± 0,044	-0,32 ± 0,052	-- ± --	-- ± --	-0,31 ± 0,078	-0,18 ± 0,096	-0,30 ± 0,053	-0,93 ± 0,068
	CAP	15	0,69 ± 0,113	1,53 ± 0,087	1,45 ± 0,059	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	1,29 ± 0,075	-- ± --
		60	-0,50 ± 0,046	0,51 ± 0,053	-0,37 ± 0,051	1,51 ± 0,048	-0,48 ± 0,055	-0,17 ± 0,058	-- ± --	1,35 ± 0,056	-0,19 ± 0,227
		15	-0,78 ± 0,095	-0,07 ± 0,085	-0,25 ± 0,181	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
Espermatozoides intermedios	NC	30	0,69 ± 0,114	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	-0,30 ± 0,094	-0,25 ± 0,145	-0,34 ± 0,202	-- ± --	-- ± --	-0,38 ± 0,147	-0,10 ± 0,242	-0,21 ± 0,099	-0,66 ± 0,118
		15	0,56 ± 0,281	1,40 ± 0,307	1,69 ± 0,159	±	±	-- ± --	-- ± --	1,47 ± 0,306	-- ± --
	CAP	60	-0,33 ± 0,156	0,59 ± 0,126	-0,49 ± 0,284	1,71 ± 0,344	-0,50 ± 0,195	0,25 ± 0,307	-- ± --	1,05 ± 0,153	-- ± --
		15	-0,63 ± 0,086	-0,08 ± 0,072	-0,58 ± 0,123	-- ± --	-- ± --	-0,36 ± 0,365	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	0,67 ± 0,095	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
Espermatozoides hiperactivos	NC	60	-0,62 ± 0,092	-0,29 ± 0,139	-0,15 ± 0,180	-- ± --	-- ± --	-0,32 ± 0,132	-0,53 ± 0,124	-0,35 ± 0,091	-0,72 ± 0,095
		15	0,58 ± 0,190	1,57 ± 0,174	1,43 ± 0,135	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	1,32 ± 0,177	-- ± --
	CAP	60	-0,49 ± 0,117	0,49 ± 0,124	-0,33 ± 0,121	1,63 ± 0,330	-0,29 ± 0,123	-0,15 ± 0,175	-- ± --	1,37 ± 0,110	0,25 ± 0,729
		15	0,58 ± 0,190	1,57 ± 0,174	1,43 ± 0,135	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	1,32 ± 0,177	-- ± --

Promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación de los componentes principales de la velocidad (OSV 1 y 2), tras 60 min de incubación en condiciones capacitantes (CAP), a distinta concentración de zinc (Zn) o su quelante TPEN (T).

Todas las concentraciones están indicadas en µM.

10ZnCo10T: Co-incubación con 10 µM de zinc y 10 µM de TPEN. 50ZnCo50T: Co-incubación con 50 µM de zinc y 50 µM de TPEN.

10TPost10Zn: Adición de 10 µM de zinc tras 10 min de incubación con 10 µM de TPEN.

50TPost50Zn: Adición de 50 µM de zinc tras 10 min de incubación con 50 µM de TPEN.

**Tabla S4.10:** Variación de los componentes principales de la trayectoria

OTS 1		CONTROL	10Zn	50Zn	10T	50T	10ZnCo10T	50ZnCo50T	10Tpost10Zn	50Tpost50Zn	
Espermatozoides progresivos	NC	15	0,47 ± 0,059	0,11 ± 0,059	0,33 ± 0,103	-- -- --	-- ± --	0,17 ± 0,172	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	-0,55 ± 0,076	-- ± --	-- ± --	-- -- --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	0,60 ± 0,085	0,36 ± 0,052	0,24 ± 0,061	-- -- --	-- ± --	0,35 ± 0,092	0,00 ± 0,114	0,15 ± 0,063	0,90 ± 0,081
	CAP	15	-0,57 ± 0,061	-1,02 ± 0,103	-0,97 ± 0,069	±	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-1,22 ± 0,089	-- ± --
		30	0,33 ± 0,133	-0,62 ± 0,062	0,22 ± 0,059	-1,06 ± 0,057	0,42 ± 0,065	0,18 ± 0,068	-- ± --	-1,09 ± 0,066	-0,19 ± 0,268
		60	0,61 ± 0,111	0,02 ± 0,092	0,21 ± 0,206	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
Espermatozoides intermedios	NC	15	-0,57 ± 0,109	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	0,20 ± 0,129	0,06 ± 0,163	0,26 ± 0,229	-- ± --	-- ± --	0,47 ± 0,167	0,16 ± 0,277	0,01 ± 0,108	0,57 ± 0,133
		60	-0,56 ± 0,205	-0,99 ± 0,351	-0,99 ± 0,181	±	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-1,18 ± 0,350	-- ± --
	CAP	15	0,17 ± 0,321	-0,45 ± 0,140	0,72 ± 0,323	-1,25 ± 0,393	0,36 ± 0,220	-0,17 ± 0,351	-- ± --	-0,76 ± 0,174	-- ± --
		30	0,51 ± 0,105	0,04 ± 0,083	0,59 ± 0,143	-- ± --	-- ± --	0,37 ± 0,428	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	-0,61 ± 0,100	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
Espermatozoides hiperactivos	CAP	15	0,52 ± 0,111	0,21 ± 0,160	0,09 ± 0,209	-- ± --	-- ± --	0,53 ± 0,154	0,67 ± 0,146	0,17 ± 0,105	0,76 ± 0,110
		30	-0,36 ± 0,153	-1,08 ± 0,203	-0,90 ± 0,157	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-1,23 ± 0,208	-- ± --
		60	0,22 ± 0,223	-0,57 ± 0,141	0,28 ± 0,139	-1,13 ± 0,387	0,07 ± 0,142	0,03 ± 0,205	-- ± --	-0,93 ± 0,128	-0,43 ± 0,856

**Tabla S4.10 Cont:** Variación de los componentes principales de la trayectoria

OTS 2		CONTROL	10Zn	50Zn	10T	50T	10ZnCo10T	50ZnCo50T	10Tpost10Zn	50Tpost50Zn	
Espermatozoides progresivos	15	0,49 ± 0,084	0,09 ± 0,065	0,78 ± 0,113	-- ± --	-- ± --	0,77 ± 0,189	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	NC	30	0,44 ± 0,094	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	0,30 ± 0,054	0,25 ± 0,057	0,08 ± 0,067	-- ± --	-- ± --	0,25 ± 0,101	0,00 ± 0,125	-0,29 ± 0,069	0,60 ± 0,089
	CAP	15	0,81 ± 0,147	0,18 ± 0,114	0,31 ± 0,076	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-0,52 ± 0,098	-- ± --
		60	-0,61 ± 0,060	0,71 ± 0,069	-0,43 ± 0,066	0,08 ± 0,062	-0,57 ± 0,072	0,26 ± 0,075	-- ± --	0,12 ± 0,073	0,35 ± 0,295
	Espermatozoides intermedios	15	0,67 ± 0,119	0,02 ± 0,118	0,69 ± 0,232	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
NC		30	0,24 ± 0,148	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	0,07 ± 0,133	0,18 ± 0,189	0,38 ± 0,261	-- ± --	-- ± --	0,16 ± 0,188	-0,15 ± 0,303	-0,32 ± 0,136	0,60 ± 0,152
CAP		15	0,67 ± 0,354	0,19 ± 0,387	0,36 ± 0,201	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	0,43 ± 0,383	-- ± --
		60	-0,71 ± 0,211	0,85 ± 0,170	-0,36 ± 0,365	0,03 ± 0,436	-0,54 ± 0,252	0,54 ± 0,386	-- ± --	0,39 ± 0,196	-- ± --
Espermatozoides hiperactivos		15	0,66 ± 0,103	0,15 ± 0,087	0,73 ± 0,147	-- ± --	-- ± --	0,36 ± 0,437	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	NC	30	0,33 ± 0,114	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	0,17 ± 0,112	0,00 ± 0,167	-0,06 ± 0,216	-- ± --	-- ± --	0,14 ± 0,158	-0,02 ± 0,149	-0,29 ± 0,109	0,50 ± 0,114
	CAP	15	1,14 ± 0,228	0,20 ± 0,208	0,31 ± 0,162	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-0,35 ± 0,212	-- ± --
		60	-0,65 ± 0,142	0,62 ± 0,151	-0,68 ± 0,146	-0,13 ± 0,396	-0,40 ± 0,148	-0,06 ± 0,209	-- ± --	0,14 ± 0,132	0,78 ± 0,873

Promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación de los componentes principales de la trayectoria (OTS 1 y 2), tras 60 min de incubación en condiciones capacitantes (CAP), a distinta concentración de zinc (Zn) o su quelante TPEN (T).

Todas las concentraciones están indicadas en µM.

10ZnCo10T: Co-incubación con 10 µM de zinc y 10 µM de TPEN. 50ZnCo50T: Co-incubación con 50 µM de zinc y 50 µM de TPEN.

10TPost10Zn: Adición de 10 µM de zinc tras 10 min de incubación con 10 µM de TPEN.

50TPost50Zn: Adición de 50 µM de zinc tras 10 min de incubación con 50 µM de TPEN.



Tabla S5.1. Porcentaje de espermatozoides vigorosos en función de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Medio	Tiempo (min)	Control	15 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	70 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	300 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	500 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	700 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
NC	15	76,00 ± 2,632	78,00 ± 2,564	76,00 ± 2,632	74,00 ± 2,703	70,00 ± 2,857	61,00 ± 3,279	60,00 ± 3,333	58,00 ± 3,448	55,00 ± 3,636
	30	70,00 ± 4,286	68,00 ± 4,412	72,00 ± 4,167	66,00 ± 4,545	58,00 ± 5,172	55,00 ± 5,455	40,00 ± 7,500	30,00 ± 10,000	29,00 ± 10,345
	60	60,00 ± 10,000	56,00 ± 10,714	56,00 ± 10,714	52,00 ± 11,538	64,00 ± 9,375	50,00 ± 12,000	36,00 ± 16,667	20,00 ± 30,000	0,00 ± 0,000
	90	58,00 ± 13,793	52,00 ± 15,385	66,00 ± 12,121	42,00 ± 19,048	62,00 ± 12,903	42,00 ± 19,048	20,00 ± 40,000	15,00 ± 53,333	0,00 ± 0,000
CAP	15	80,00 ± 2,500	82,00 ± 2,439	78,00 ± 2,564	76,00 ± 2,632	68,00 ± 2,941	60,00 ± 3,333	59,00 ± 3,390	55,00 ± 3,636	49,00 ± 4,082
	30	82,00 ± 3,659	84,00 ± 3,571	80,00 ± 3,750	80,00 ± 3,750	69,00 ± 4,348	57,00 ± 5,263	55,00 ± 5,455	49,00 ± 6,122	47,00 ± 6,383
	60	78,00 ± 7,692	80,00 ± 7,500	72,00 ± 8,333	66,00 ± 9,091	50,00 ± 12,000	54,00 ± 11,111	48,00 ± 12,500	38,00 ± 15,789	22,00 ± 27,273
	90	75,00 ± 10,667	77,00 ± 10,390	61,00 ± 13,115	54,00 ± 14,815	42,00 ± 19,048	42,00 ± 19,048	38,00 ± 21,053	29,00 ± 27,586	0,00 ± 0,000
		0 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	15 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	70 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	300 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	500 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
NC + BSA	15	78,00 ± 2,564	80,00 ± 2,500	79,00 ± 2,532	78,00 ± 2,564	70,00 ± 2,857	62,00 ± 3,226	61,00 ± 3,279	57,00 ± 3,509	
	30	72,00 ± 4,167	70,00 ± 4,286	68,00 ± 4,412	82,00 ± 3,659	71,00 ± 4,225	59,00 ± 5,085	57,00 ± 5,263	51,00 ± 5,882	
	60	62,00 ± 9,677	58,00 ± 10,345	55,00 ± 10,909	68,00 ± 8,824	52,00 ± 11,538	56,00 ± 10,714	50,00 ± 12,000	40,00 ± 15,000	
	90	60,00 ± 13,333	54,00 ± 14,815	50,00 ± 16,000	56,00 ± 14,286	44,00 ± 18,182	44,00 ± 18,182	40,00 ± 20,000	40,00 ± 20,000	
NC + BIC	15	76,00 ± 2,632	80,00 ± 2,500	79,00 ± 2,532	78,00 ± 2,564	70,00 ± 2,857	62,00 ± 3,226	61,00 ± 3,279	57,00 ± 3,509	
	30	74,00 ± 4,054	72,00 ± 4,167	70,00 ± 4,286	84,00 ± 3,571	73,00 ± 4,110	61,00 ± 4,918	59,00 ± 5,085	53,00 ± 5,660	
	60	60,00 ± 10,000	56,00 ± 10,714	53,00 ± 11,321	66,00 ± 9,091	50,00 ± 12,000	54,00 ± 11,111	48,00 ± 12,500	38,00 ± 15,789	
	90	62,00 ± 12,903	51,00 ± 15,686	47,00 ± 17,021	53,00 ± 15,094	41,00 ± 19,512	41,00 ± 19,512	37,00 ± 21,622	37,00 ± 21,622	

Valor promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación en el porcentaje de espermatozoides vigorosos a lo largo de la incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), a distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). En la parte inferior de la tabla, el medio de cultivo era medio de supervivencia suplementado con albúmina de suero bovino (BSA) [10 mg/mL] o bicarbonato sódico (BIC) [15 mM].

**Tabla S5.2. Porcentaje de espermatozoides vigorosos en función de la concentración de catalasa.**

Medio	Tiempo (min)	Control	132 UCAT/mL	300 UCAT/mL	3000 UCAT/mL	5294 UCAT/mL	8823 UCAT/mL
<b>NC</b>	15	76,00 ± 2,632	75,00 ± 2,667	73,00 ± 2,740	72,00 ± 2,778	-- ± --	-- ± --
	30	70,00 ± 4,286	69,00 ± 4,348	66,00 ± 4,545	41,00 ± 7,317	-- ± --	-- ± --
	60	60,00 ± 10,000	58,00 ± 10,345	54,00 ± 11,111	50,00 ± 12,000	-- ± --	-- ± --
	90	58,00 ± 13,793	55,00 ± 14,545	51,00 ± 15,686	43,00 ± 18,605	-- ± --	-- ± --
<b>CAP</b>	15	80,00 ± 2,500	79,00 ± 2,532	77,00 ± 2,597	75,00 ± 2,667	73,00 ± 2,740	71,00 ± 2,817
	30	82,00 ± 3,659	80,00 ± 3,750	76,00 ± 3,947	72,00 ± 4,167	68,00 ± 4,412	64,00 ± 4,688
	60	78,00 ± 7,692	74,00 ± 8,108	66,00 ± 9,091	58,00 ± 10,345	57,00 ± 10,526	49,00 ± 12,245
	90	75,00 ± 10,667	67,00 ± 11,940	61,00 ± 13,115	55,00 ± 14,545	49,00 ± 16,327	45,00 ± 17,778

Promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación en el porcentaje de espermatozoides vigorosos a lo largo de la incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), a distintas concentraciones de Catalasa (CAT). Todas las concentraciones están expresadas en unidades enzimáticas de Catalasa por mililitro.

**Tabla S5.3** Variaciones en el porcentaje de cada clase espermática debidas a los radicales libres

	Tiempo (min)	Control NC	Control CAP	15 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	30 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	50 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	70 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	100 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$
<b>Espermatozoides progresivos</b>	15	99,07 <sup>c</sup> $\pm$ 2,023	98,41 <sup>c</sup> $\pm$ 2,032	99,21 <sup>c</sup> $\pm$ 2,023	98,05 <sup>c</sup> $\pm$ 2,023	96,70 <sup>ab</sup> $\pm$ 2,023	95,00 <sup>ab</sup> $\pm$ 2,023	95,00 <sup>ab</sup> $\pm$ 2,023
	30	98,41 <sup>c</sup> $\pm$ 2,040	92,42 <sup>a</sup> $\pm$ 2,098	98,11 <sup>c</sup> $\pm$ 2,040	95,22 <sup>ab</sup> $\pm$ 2,040	93,19 <sup>a</sup> $\pm$ 2,040	98,98 <sup>c</sup> $\pm$ 2,040	99,38 <sup>c</sup> $\pm$ 2,040
	60	98,15 <sup>c</sup> $\pm$ 2,046	92,23 <sup>a</sup> $\pm$ 2,063	99,48 <sup>c</sup> $\pm$ 2,046	99,52 <sup>c</sup> $\pm$ 2,046	97,96 <sup>bc</sup> $\pm$ 2,046	97,29 <sup>bc</sup> $\pm$ 2,046	98,63 <sup>c</sup> $\pm$ 2,046
	90	98,79 <sup>c</sup> $\pm$ 2,030	97,34 <sup>bc</sup> $\pm$ 2,035	92,58 <sup>a</sup> $\pm$ 2,030	97,94 <sup>bc</sup> $\pm$ 2,030	91,84 <sup>a</sup> $\pm$ 2,030	100,00 <sup>c</sup> $\pm$ 2,03	-- $\pm$ 2,030
<b>Espermatozoides intermedios</b>	15	0,81 <sup>e</sup> $\pm$ 0,041	1,59 <sup>k</sup> $\pm$ 0,079	0,53 <sup>c</sup> $\pm$ 0,026	1,37 <sup>j</sup> $\pm$ 0,068	2,75 <sup>n</sup> $\pm$ 0,137	4,00 <sup>o</sup> $\pm$ 0,200	4,00 <sup>o</sup> $\pm$ 0,200
	30	0,87 <sup>f</sup> $\pm$ 0,043	4,21 <sup>o</sup> $\pm$ 0,211	1,60 <sup>k</sup> $\pm$ 0,080	2,77 <sup>n</sup> $\pm$ 0,139	2,88 <sup>n</sup> $\pm$ 0,144	0,61 <sup>d</sup> $\pm$ 0,031	0,62 <sup>d</sup> $\pm$ 0,031
	60	1,41 <sup>j</sup> $\pm$ 0,070	3,42 <sup>n</sup> $\pm$ 0,171	0,39 <sup>b</sup> $\pm$ 0,019	0,24 <sup>a</sup> $\pm$ 0,012	2,04 <sup>m</sup> $\pm$ 0,102	2,71 <sup>n</sup> $\pm$ 0,136	1,37 <sup>j</sup> $\pm$ 0,068
	90	0,99 <sup>g</sup> $\pm$ 0,050	1,83 <sup>l</sup> $\pm$ 0,092	2,166 <sup>m</sup> $\pm$ 0,108	0,88 <sup>e</sup> $\pm$ 0,044	4,08 <sup>o</sup> $\pm$ 0,204	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --
<b>Espermatozoides hiperactivos</b>	15	0,12 <sup>b</sup> $\pm$ 0,006	0,00 <sup>a</sup> $\pm$ 0,000	0,26 <sup>c</sup> $\pm$ 0,013	0,59 <sup>f</sup> $\pm$ 0,029	0,55 <sup>f</sup> $\pm$ 0,027	1,00 <sup>i</sup> $\pm$ 0,050	1,00 <sup>i</sup> $\pm$ 0,050
	30	0,72 <sup>g</sup> $\pm$ 0,036	3,37 <sup>l</sup> $\pm$ 0,169	0,29 <sup>d</sup> $\pm$ 0,015	2,01 <sup>k</sup> $\pm$ 0,100	3,93 <sup>m</sup> $\pm$ 0,196	0,41 <sup>e</sup> $\pm$ 0,020	0,00 <sup>a</sup> $\pm$ 0,000
	60	0,44 <sup>e</sup> $\pm$ 0,022	4,35 <sup>m</sup> $\pm$ 0,218	0,13 <sup>b</sup> $\pm$ 0,006	0,24 <sup>c</sup> $\pm$ 0,012	0,00 <sup>a</sup> $\pm$ 0,000	0,00 <sup>a</sup> $\pm$ 0,000	0,00 <sup>a</sup> $\pm$ 0,000
	90	0,22 <sup>c</sup> $\pm$ 0,011	0,83 <sup>h</sup> $\pm$ 0,042	5,26 <sup>n</sup> $\pm$ 0,263	1,18 <sup>j</sup> $\pm$ 0,059	4,08 <sup>m</sup> $\pm$ 0,204	-- $\pm$ --	-- $\pm$ --

Valor promedio  $\pm$  S.E.M calculado por el SPSS, de la variación en el porcentaje de cada clase espermática (progresivos, intermedios o hiperactivos), a lo largo de la incubación en condiciones de supervivencia (NC), en suspensiones espermáticas a distinta concentración de radicales libres ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). CAP = Control de condiciones capacitantes.

Todos los resultados se expresan en porcentaje.

Los niveles de significación, de cada clase espermática, se indican mediante letras.

Tabla S5.4 Variaciones en el porcentaje de cada clase espermática debidas a la Catalasa

Medio	Clase espermática	Tiempo (min)	Control	132 U CAT/mL	300 U CAT/mL	3000 U CAT/mL	5294 U CAT/mL	8823 U CAT/mL
NC	Espermatozoides progresivos	15	99,07 <sup>b</sup> ± 2,023	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	98,41 <sup>b</sup> ± 2,040	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	98,15 <sup>b</sup> ± 2,046	83,78 <sup>a</sup> ± 4,189	84,72 <sup>a</sup> ± 4,236	95,65 <sup>b</sup> ± 2,783	-- ± --	-- ± --
		90	98,79 <sup>b</sup> ± 2,030	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides intermedios	15	0,62 <sup>a</sup> ± 0,031	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	0,80 <sup>b</sup> ± 0,040	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	0,93 <sup>c</sup> ± 0,046	6,08 <sup>e</sup> ± 0,304	6,25 <sup>e</sup> ± 0,313	4,35 <sup>d</sup> ± 0,217	-- ± --	-- ± --
		90	0,61 <sup>a</sup> ± 0,030	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides hiperactivos	15	0,31 <sup>c</sup> ± 0,015	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	0,53 <sup>d</sup> ± 0,027	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	0,62 <sup>e</sup> ± 0,031	10,14 <sup>g</sup> ± 0,507	9,03 <sup>f</sup> ± 0,451	0,00 <sup>a</sup> ± 0,000	-- ± --	-- ± --
		90	0,40 <sup>b</sup> ± 0,020	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
CAP	Espermatozoides progresivos	15	98,41 <sup>f</sup> ± 2,032	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	92,42 <sup>e</sup> ± 2,098	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	92,23 <sup>e</sup> ± 2,063	63,12 <sup>b</sup> ± 3,156	64,10 <sup>b</sup> ± 3,205	57,20 <sup>a</sup> ± 2,860	88,80 <sup>d</sup> ± 4,440	79,69 <sup>c</sup> ± 3,984
		90	97,34 <sup>f</sup> ± 2,035	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides intermedios	15	1,59 <sup>a</sup> ± 0,079	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	4,21 <sup>d</sup> ± 0,211	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	3,42 <sup>c</sup> ± 0,171	14,54 <sup>f</sup> ± 0,727	13,92 <sup>f</sup> ± 0,696	14,76 <sup>f</sup> ± 0,738	6,00 <sup>e</sup> ± 0,300	6,25 <sup>e</sup> ± 0,313
		90	1,83 <sup>b</sup> ± 0,092	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides hiperactivos	15	0,00 <sup>a</sup> ± 0,000	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	3,37 <sup>c</sup> ± 0,169	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	4,35 <sup>d</sup> ± 0,218	22,34 <sup>g</sup> ± 1,117	21,98 <sup>g</sup> ± 1,099	28,04 <sup>h</sup> ± 1,402	5,20 <sup>e</sup> ± 0,260	14,06 <sup>f</sup> ± 0,703
		90	0,83 <sup>b</sup> ± 0,042	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --

Promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación en el porcentaje de cada clase espermática (progresivos, intermedios o hiperactivos), a lo largo de la incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), en suspensiones espermáticas a distinta concentración de Catalasa (CAT). Todos los resultados se expresan en porcentaje.

Los niveles de significación, de cada clase espermática y medio de cultivo, se indican mediante letras.

**Tabla S5.5** Intensidad relativa de la señal debida a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

BSA	HCO <sup>3-</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ( $\mu$ M)	Tiempo (min)	pPKA	pY
+	+	0	60	93,49 <sup>g</sup> $\pm$ 3,126	122,23 <sup>l</sup> $\pm$ 4,495
-	-	0	60	35,15 <sup>d</sup> $\pm$ 3,573	70,15 <sup>f</sup> $\pm$ 6,358
+	+	0	30	61,13 <sup>f</sup> $\pm$ 3,200	72,20 <sup>fg</sup> $\pm$ 2,100
+	+	15	30	59,13 <sup>f</sup> $\pm$ 0,600	77,20 <sup>fg</sup> $\pm$ 4,000
+	+	50	30	58,66 <sup>f</sup> $\pm$ 0,900	74,20 <sup>fg</sup> $\pm$ 2,000
+	+	70	30	60,35 <sup>f</sup> $\pm$ 3,200	72,85 <sup>fg</sup> $\pm$ 6,200
+	+	100	30	59,28 <sup>f</sup> $\pm$ 1,000	74,85 <sup>fg</sup> $\pm$ 3,800
+	+	150	30	61,57 <sup>f</sup> $\pm$ 2,000	74,47 <sup>fg</sup> $\pm$ 2,500
+	+	250	30	63,25 <sup>f</sup> $\pm$ 1,000	75,85 <sup>fg</sup> $\pm$ 0,800
-	-	30	90	58,08 <sup>f</sup> $\pm$ 5,257	123,59 <sup>l</sup> $\pm$ 4,310
-	-	50	90	28,62 <sup>c</sup> $\pm$ 1,031	87,67 <sup>h</sup> $\pm$ 6,635
-	-	75	90	30,30 <sup>c</sup> $\pm$ 1,469	75,79 <sup>fg</sup> $\pm$ 3,271
-	-	90	90	59,23 <sup>f</sup> $\pm$ 5,675	88,02 <sup>e-h</sup> $\pm$ 28,581
-	-	100	90	13,52 <sup>a</sup> $\pm$ 1,672	80,90 <sup>fg</sup> $\pm$ 6,294
+	-	0	90	37,31 <sup>d</sup> $\pm$ 3,515	58,18 <sup>e</sup> $\pm$ 4,496
+	-	15	90	40,55 <sup>d</sup> $\pm$ 1,144	41,66 <sup>b</sup> $\pm$ 1,483
+	-	50	90	39,75 <sup>d</sup> $\pm$ 1,978	47,87 <sup>d</sup> $\pm$ 3,130
+	-	70	90	39,67 <sup>d</sup> $\pm$ 11,708	43,17 <sup>abc</sup> $\pm$ 4,172
+	-	100	90	48,73 <sup>de</sup> $\pm$ 10,530	42,76 <sup>c</sup> $\pm$ 0,862
+	-	150	90	44,33 <sup>de</sup> $\pm$ 2,293	28,56 <sup>a</sup> $\pm$ 4,418
+	-	250	90	51,50 <sup>ef</sup> $\pm$ 6,933	36,66 <sup>ab</sup> $\pm$ 3,805
-	+	0	90	83,74 <sup>f</sup> $\pm$ 22,724	49,90 <sup>d</sup> $\pm$ 2,775
-	+	15	90	25,09 <sup>b</sup> $\pm$ 1,218	57,54 <sup>de</sup> $\pm$ 10,356
-	+	50	90	46,85 <sup>e</sup> $\pm$ 1,110	80,96 <sup>g</sup> $\pm$ 3,491
-	+	70	90	23,56 <sup>b</sup> $\pm$ 1,100	51,90 <sup>d</sup> $\pm$ 2,775
-	+	100	90	43,27 <sup>de</sup> $\pm$ 15,164	52,97 <sup>de</sup> $\pm$ 3,278
-	+	150	90	41,30 <sup>de</sup> $\pm$ 13,358	53,90 <sup>de</sup> $\pm$ 3,775

Promedio  $\pm$  S.E.M calculado por el SPSS, de la variación en la intensidad relativa de la señal de los *Blots* realizados para determinar la fosforilación de proteínas diana de la proteína quinasa A (pPKA) y de las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina (pY), a los 30, 60 o 90 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC; sin BSA ni bicarbonato sódico), capacitantes (CAP; con BSA y bicarbonato sódico), o medio NC suplementado con BSA o bicarbonato sódico, a distinta concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (expresada en micromolar,  $\mu$ M).

Todos los resultados se expresan en porcentaje.

Los niveles de significación, de cada tipo de proteínas, se indican mediante letras.

BSA = Albúmina de suero fetal. HCO<sup>3-</sup> bicarbonato sódico.

**Tabla S5.6** Intensidad relativa de la señal debido a la Catalasa

Medio	Catalasa (U CAT/mL)	pPKA	pY
<b>NC</b>	0	31,97 <sup>b</sup> ± 4,016	65,99 <sup>a</sup> ± 12,614
	130	38,36 <sup>c</sup> ± 1,152	55,80 <sup>a</sup> ± 19,968
	300	46,27 <sup>d</sup> ± 5,881	107,32 <sup>c</sup> ± 8,778
	441	19,07 <sup>a</sup> ± 2,607	99,23 <sup>bc</sup> ± 11,039
	3000	17,72 <sup>a</sup> ± 1,917	85,54 <sup>b</sup> ± 5,286
<b>CAP</b>	0	113,26 <sup>g</sup> ± 6,805	140,60 <sup>e</sup> ± 9,135
	300	45,97 <sup>cd</sup> ± 7,895	126,37 <sup>d</sup> ± 6,460
	3000	57,70 <sup>de</sup> ± 11,872	110,35 <sup>c</sup> ± 7,157
	5290	70,19 <sup>f</sup> ± 4,056	128,13 <sup>d</sup> ± 5,147
	8823	54,62 <sup>e</sup> ± 1,552	162,21 <sup>f</sup> ± 1,966

Promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación en la intensidad relativa de la señal de los *Blots* realizados para determinar la fosforilación de proteínas diana de la proteína quinasa A (pPKA) y de las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina (pY), tras 60 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP) a distinta concentración de Catalasa (CAT). Todos los resultados se expresan en porcentaje. Los niveles de significación de cada tipo de proteína se indican mediante letras. Las unidades de concentración de Catalasa son “Unidades catalíticas de Catalasa por mililitro”.

**Tabla S5.7** Variaciones en los parámetros de la velocidad espermática debidas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Clase espermática	TIEMPO (min)	CAP control		NC Control		NC + 15 µm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		NC + 30 µm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		NC + 50 µm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		NC + 70 µm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		NC + 100 µm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
VAP	Espermatozoides progresivos	15	66,12	± 25,565	90,21	± 33,405	83,72	± 25,405	94,47	± 42,275	105,64	± 41,032	94,73	± 37,187	94,73	± 37,187
		30	73,91	± 37,444	91,31	± 42,923	76,86	± 27,368	79,24	± 36,466	144,99	± 39,406	75,31	± 33,232	63,10	± 23,428
		60	70,67	± 40,597	78,98	± 34,288	75,76	± 31,224	67,56	± 29,894	70,89	± 25,540	63,76	± 28,449	62,10	± 25,794
		90	59,18	± 25,389	78,58	± 34,388	77,40	± 30,420	74,36	± 36,035	127,04	± 42,557	142,40	± 11,597	--	± --
	Espermatozoides intermedios	15	93,87	± 27,988	115,12	± 34,357	96,99	± 34,729	147,45	± 17,562	119,05	± 34,005	145,67	± 24,311	145,67	± 24,311
		30	146,72	± 42,829	97,50	± 28,173	119,41	± 19,697	126,07	± 39,493	144,40	± 46,638	109,47	± 29,341	96,40	± 26,407
		60	160,48	± 45,851	113,79	± 30,370	138,97	± 29,900	135,27	± 33,456	83,67	± 22,498	122,90	± 25,388	99,71	± 4,465
		90	127,51	± 42,099	106,16	± 35,334	110,75	± 18,501	88,12	± 24,901	216,70	± 139,159	--	± --	--	± --
	Espermatozoides hiperactivos	15	--	± --	95,46	± 32,158	95,06	± 31,586	125,45	± 32,532	85,91	± 37,519	101,11	± 13,459	101,11	± 13,459
		30	113,89	± 45,226	139,44	± 49,307	75,98	± 8,296	126,79	± 30,312	162,88	± 27,806	135,80	± 20,930	--	± --
		60	152,10	± 31,432	100,30	± 22,138	105,33	± 30,258	82,71	± 30,852	--	± --	--	± --	--	± --
		90	144,34	± 38,728	92,75	± 11,602	99,86	± 29,327	114,99	± 13,070	128,15	± 10,960	--	± --	--	± --
VSL	Espermatozoides progresivos	15	47,25	± 24,994	74,29	± 34,934	67,70	± 27,058	77,39	± 44,130	88,40	± 42,717	76,53	± 38,587	76,53	± 38,587
		30	51,56	± 35,008	76,16	± 43,759	61,33	± 28,268	63,53	± 36,198	130,68	± 43,188	58,62	± 30,942	47,58	± 21,677
		60	48,48	± 38,665	63,16	± 35,534	60,35	± 32,759	52,76	± 29,712	56,02	± 24,343	47,78	± 27,565	46,38	± 24,311
		90	37,41	± 22,497	60,38	± 36,254	58,74	± 31,647	59,15	± 36,026	113,17	± 46,114	127,70	± 10,182	--	± --
	Espermatozoides intermedios	15	60,56	± 32,575	84,43	± 37,754	69,83	± 36,678	107,81	± 37,829	94,52	± 37,974	113,33	± 39,332	113,33	± 39,332
		30	100,28	± 38,288	55,98	± 25,163	96,40	± 24,098	91,89	± 33,248	91,43	± 22,573	71,40	± 21,441	68,35	± 29,387
		60	108,63	± 49,211	87,14	± 36,661	91,73	± 51,346	79,33	± 29,712	57,97	± 22,661	91,61	± 26,536	63,75	± 6,741
		90	89,53	± 40,270	69,39	± 36,520	59,47	± 20,351	49,05	± 16,184	187,90	± 112,854	--	± --	--	± --
	Espermatozoides hiperactivos	15	--	± --	44,11	± 36,344	45,90	± 31,868	51,16	± 10,891	35,65	± 40,345	45,82	± 6,361	45,82	± 6,361
		30	35,51	± 27,964	39,71	± 20,093	36,89	± 2,868	48,29	± 22,069	48,20	± 16,979	30,60	± 17,961	--	± --
		60	51,99	± 17,799	48,47	± 12,551	66,17	± 42,052	35,05	± 29,712	--	± --	--	± --	--	± --
		90	47,45	± 20,637	40,73	± 11,911	27,35	± 15,830	46,56	± 24,767	44,80	± 49,073	--	± --	--	± --

**Tabla S5.7 Cont.** Variaciones en los parámetros de la velocidad espermática debidas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Clase espermática	TIEMPO (min)	CAP control	NC Control	NC + 15 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 30 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 50 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 70 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 100 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Espermatozoides progresivos</b>	15	128,33 ± 42,613	149,95 ± 52,243	138,51 ± 35,159	168,01 ± 65,769	193,58 ± 70,211	169,13 ± 62,597	169,13 ± 62,597
	30	147,86 ± 62,052	151,11 ± 57,598	134,83 ± 47,523	144,89 ± 56,943	208,28 ± 53,399	147,74 ± 48,457	130,88 ± 40,382
	60	137,10 ± 65,705	138,43 ± 56,828	132,77 ± 47,570	122,85 ± 50,989	126,71 ± 45,712	133,21 ± 49,949	129,07 ± 42,573
	90	119,13 ± 45,419	145,25 ± 54,305	141,38 ± 48,702	136,80 ± 57,786	193,10 ± 47,870	227,70 ± 1,838	-- ± --
<b>Espermatozoides intermedios</b>	15	241,09 ± 50,705	279,94 ± 73,797	258,22 ± 50,153	350,72 ± 89,613	307,24 ± 72,293	340,26 ± 70,064	340,26 ± 70,064
	30	319,38 ± 71,483	235,62 ± 43,309	304,83 ± 45,163	298,04 ± 58,945	291,17 ± 35,778	257,87 ± 24,665	260,55 ± 34,257
	60	325,12 ± 84,057	294,75 ± 65,979	286,55 ± 82,366	289,01 ± 50,989	237,02 ± 26,355	313,07 ± 46,102	256,23 ± 15,866
	90	286,94 ± 63,937	254,96 ± 64,480	235,37 ± 44,943	215,59 ± 31,022	452,30 ± 179,605	-- ± --	-- ± --
<b>Espermatozoides hiperactivos</b>	15	-- ± --	248,36 ± 63,020	230,89 ± 42,656	253,89 ± 26,736	216,76 ± #¡DIV/0!	240,58 ± 23,286	240,58 ± --
	30	245,02 ± 79,178	278,08 ± 78,859	222,10 ± 14,239	300,53 ± 37,931	295,43 ± 45,123	293,75 ± 95,247	-- ± --
	60	281,40 ± 54,142	296,10 ± 47,499	294,58 ± 64,968	230,32 ± 50,989	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	90	272,28 ± 35,572	239,43 ± 61,527	202,24 ± 39,660	259,92 ± 71,508	344,20 ± 2,263	-- ± --	-- ± --

Promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación de los parámetros de la velocidad espermática, tras 90 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), a distinta concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Todas las concentraciones están indicadas en µM.



**Tabla S5.8** Variaciones en los parámetros de la trayectoria espermática debidas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Clase espermática	TIEMPO (min)	CAP control		NC Control		NC + 15 µm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		NC + 30 µm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		NC + 50 µm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		NC + 70 µm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		NC + 100 µm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
ALH	Espermatozoides progresivos	15	6,21 ± 1,759	6,28 ± 1,629	5,82 ± 1,251	6,67 ± 1,786	7,32 ± 1,837	6,42 ± 1,764	6,42 ± 1,764							
		30	7,49 ± 3,887	6,56 ± 2,103	5,78 ± 1,439	6,29 ± 2,130	9,54 ± 4,371	6,48 ± 2,552	5,52 ± 1,364							
		60	7,21 ± 3,823	6,19 ± 1,714	5,66 ± 1,460	5,51 ± 1,566	5,70 ± 1,659	5,71 ± 1,417	5,67 ± 1,386							
		90	5,99 ± 2,394	6,19 ± 1,537	6,33 ± 1,794	5,94 ± 1,679	9,19 ± 4,470	9,80 ± 0,707	-- ± --							
	Espermatozoides intermedios	15	8,38 ± 2,478	9,86 ± 2,005	10,63 ± 0,026	10,85 ± 1,534	9,90 ± 1,470	11,38 ± 1,219	11,38 ± 1,219							
		30	17,10 ± 5,213	9,31 ± 1,646	9,89 ± 1,521	14,08 ± 5,199	17,35 ± 5,119	14,54 ± 9,919	8,86 ± 1,767							
		60	20,16 ± 6,004	10,12 ± 1,552	11,13 ± 1,068	10,47 ± 1,566	8,85 ± 3,041	10,88 ± 0,841	11,16 ± 0,086							
		90	15,03 ± 4,846	9,75 ± 1,116	11,06 ± 1,890	8,68 ± 3,604	25,55 ± 1,485	-- ± --	-- ± --							
	Espermatozoides hiperactivos	15	-- ± --	9,56 ± 1,817	10,10 ± 0,638	8,54 ± 1,084	9,80 ± 1,653	9,02 ± 0,860	9,02 ± 0,860							
		30	13,57 ± 4,907	12,12 ± 3,399	8,60 ± 1,798	14,81 ± 4,959	17,18 ± 4,622	14,10 ± 6,788	-- ± --							
		60	19,45 ± 5,412	12,28 ± 4,661	15,03 ± 1,264	8,41 ± 1,566	-- ± --	-- ± --	-- ± --							
		90	14,83 ± 5,370	9,52 ± 1,296	10,96 ± 2,313	13,99 ± 4,710	19,25 ± 0,071	-- ± --	-- ± --							
BCF	Espermatozoides progresivos	15	5,31 ± 3,157	6,89 ± 3,881	6,59 ± 3,312	6,98 ± 4,071	7,77 ± 3,817	7,26 ± 3,967	7,26 ± 3,967							
		30	7,58 ± 8,173	8,93 ± 9,148	6,28 ± 3,406	7,04 ± 6,450	27,65 ± 13,204	8,81 ± 7,900	5,61 ± 2,831							
		60	6,74 ± 8,323	6,90 ± 6,062	6,38 ± 3,574	5,44 ± 3,293	5,69 ± 2,931	5,57 ± 3,471	5,27 ± 3,069							
		90	4,90 ± 4,578	6,14 ± 4,297	5,70 ± 3,541	5,66 ± 4,632	21,76 ± 13,842	24,30 ± 6,081	-- ± --							
	Espermatozoides intermedios	15	9,12 ± 3,875	7,68 ± 5,566	2,72 ± 1,734	7,87 ± 3,377	6,34 ± 3,454	8,96 ± 3,676	8,96 ± 3,676							
		30	22,50 ± 10,767	4,91 ± 2,104	6,93 ± 3,032	15,53 ± 11,842	22,58 ± 11,241	13,00 ± 11,759	6,25 ± 1,767							
		60	23,54 ± 9,354	7,33 ± 3,433	5,82 ± 2,955	5,71 ± 3,293	4,77 ± 0,109	6,25 ± 3,368	4,59 ± 3,612							
		90	15,70 ± 11,126	8,95 ± 9,708	4,69 ± 3,221	4,75 ± 2,111	38,65 ± 6,010	-- ± --	-- ± --							
	Espermatozoides hiperactivos	15	-- ± --	6,00 ± 4,723	5,98 ± 2,523	9,48 ± 6,532	9,09 ± 3,636	5,08 ± 1,296	5,08 ± 1,296							
		30	15,99 ± 16,487	30,90 ± 22,452	7,03 ± 1,871	26,93 ± 18,364	35,39 ± 12,566	44,30 ± 22,203	-- ± --							
		60	24,60 ± 10,489	13,21 ± 14,824	4,00 ± 3,264	3,45 ± 3,293	-- ± --	-- ± --	-- ± --							
		90	28,63 ± 14,881	3,61 ± 0,547	3,73 ± 1,864	12,64 ± 13,061	48,90 ± 15,698	-- ± --	-- ± --							

**Tabla S5.8 Cont.** Variaciones en los parámetros de la trayectoria espermática debidas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

	Clase espermática	TIEMPO (min)	CAP control	NC Control	NC + 15 µm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 30 µm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 50 µm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 70 µm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 100 µm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
STR	Espermatozoides progresivos	15	68,94 ± 13,922	79,12 ± 13,700	78,67 ± 11,979	77,68 ± 14,080	80,59 ± 12,262	77,41 ± 13,136	77,41 ± 13,136
		30	66,22 ± 15,482	79,75 ± 13,417	77,20 ± 12,200	76,84 ± 12,366	88,72 ± 9,999	75,21 ± 12,178	73,39 ± 12,618
		60	64,16 ± 16,338	76,03 ± 15,305	76,07 ± 14,315	74,86 ± 13,459	77,65 ± 10,001	71,57 ± 13,900	71,76 ± 13,401
		90	61,70 ± 15,078	72,86 ± 15,228	72,87 ± 15,933	75,11 ± 14,401	86,78 ± 9,143	89,68 ± 0,153	-- ± --
	Espermatozoides intermedios	15	61,66 ± 15,874	70,71 ± 11,398	69,70 ± 12,860	71,39 ± 18,727	76,83 ± 11,855	75,85 ± 15,873	75,85 ± 15,873
		30	66,64 ± 11,489	56,82 ± 15,746	79,63 ± 11,436	72,89 ± 12,699	65,37 ± 12,587	65,27 ± 10,745	69,33 ± 11,493
		60	65,61 ± 14,689	74,05 ± 14,906	62,86 ± 22,289	58,65 ± 13,459	68,11 ± 8,771	73,73 ± 9,800	63,84 ± 3,901
		90	67,51 ± 12,585	62,96 ± 19,011	55,05 ± 19,693	57,77 ± 19,874	88,17 ± 4,540	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides hiperactivos	15	-- ± --	46,21 ± 12,549	48,29 ± 12,419	41,08 ± 1,715	41,49 ± 12,058	46,14 ± 12,433	46,14 ± 12,433
		30	30,58 ± 16,502	29,45 ± 13,340	49,00 ± 6,750	40,16 ± 18,308	29,77 ± 9,887	23,84 ± 16,899	-- ± --
		60	34,72 ± 11,618	51,56 ± 18,073	62,82 ± 18,302	42,37 ± 13,459	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		90	35,22 ± 16,306	43,45 ± 7,407	26,93 ± 13,176	39,84 ± 17,961	33,44 ± 35,433	-- ± --	-- ± --
LIN	Espermatozoides progresivos	15	36,90 ± 14,384	49,10 ± 15,789	49,32 ± 16,877	44,69 ± 15,602	44,64 ± 12,263	44,35 ± 14,414	44,35 ± 14,414
		30	33,36 ± 12,513	49,01 ± 17,027	45,99 ± 15,557	43,21 ± 15,191	63,08 ± 15,700	38,13 ± 12,140	35,72 ± 11,256
		60	33,23 ± 13,142	44,97 ± 16,490	44,86 ± 16,519	43,25 ± 15,959	44,51 ± 11,873	34,81 ± 12,123	35,03 ± 12,163
		90	31,45 ± 11,926	40,20 ± 14,537	41,34 ± 16,189	41,66 ± 14,785	57,20 ± 14,380	56,10 ± 4,925	-- ± --
	Espermatozoides intermedios	15	23,87 ± 7,735	29,01 ± 6,178	26,16 ± 9,124	29,96 ± 3,998	29,67 ± 6,135	32,53 ± 6,186	32,53 ± 6,186
		30	30,20 ± 6,527	22,85 ± 5,696	31,10 ± 4,614	29,96 ± 5,396	31,08 ± 4,913	27,37 ± 6,281	25,71 ± 7,898
		60	32,02 ± 6,395	28,42 ± 6,505	30,42 ± 8,884	27,45 ± 15,959	24,08 ± 6,884	28,89 ± 5,159	25,01 ± 4,179
		90	29,64 ± 8,171	25,63 ± 7,331	24,68 ± 3,956	22,39 ± 4,138	39,72 ± 9,178	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides hiperactivos	15	-- ± --	17,76 ± 10,983	19,88 ± 13,000	20,01 ± 2,058	16,45 ± 9,199	19,01 ± 0,805	19,01 ± 0,805
		30	13,38 ± 6,987	14,15 ± 5,748	16,63 ± 1,243	16,01 ± 6,694	16,22 ± 5,036	9,95 ± 2,888	-- ± --
		60	18,44 ± 5,238	17,06 ± 5,475	22,46 ± 12,701	15,22 ± 15,959	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		90	17,34 ± 6,179	16,93 ± 0,624	12,72 ± 5,789	17,54 ± 5,360	13,06 ± 14,343	-- ± --	-- ± --

**Tabla S5.8 Cont.** Variaciones en los parámetros de la trayectoria espermática debidas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Clase espermática		TIEMPO (min)	CAP control	NC Control	NC + 15 µm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 30 µm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 50 µm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 70 µm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 100 µm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	<b>Espermatozoides progresivos</b>	15	52,63 ± 13,924	61,14 ± 13,712	61,45 ± 15,281	56,43 ± 13,441	55,02 ± 11,367	56,36 ± 12,419	56,36 ± 12,419
		30	49,89 ± 11,548	60,26 ± 14,832	58,62 ± 14,623	55,37 ± 14,464	70,38 ± 12,921	50,08 ± 11,378	48,30 ± 11,229
		60	51,22 ± 11,656	58,09 ± 14,181	57,94 ± 15,186	56,78 ± 15,476	56,96 ± 11,931	48,00 ± 11,530	48,05 ± 11,389
		90	50,81 ± 12,420	54,27 ± 12,373	55,63 ± 14,304	54,48 ± 13,165	65,19 ± 11,628	62,56 ± 5,598	-- ± --
<b>WOB</b>	<b>Espermatozoides intermedios</b>	15	38,61 ± 6,359	40,85 ± 4,013	36,95 ± 6,272	43,72 ± 8,093	38,36 ± 2,964	43,27 ± 3,827	43,27 ± 3,827
		30	45,46 ± 7,332	41,31 ± 9,088	39,16 ± 2,723	41,99 ± 9,481	49,07 ± 12,380	42,33 ± 10,539	36,65 ± 5,317
		60	49,62 ± 7,520	38,55 ± 4,910	49,47 ± 6,370	46,81 ± 15,476	34,99 ± 5,601	39,28 ± 5,357	39,04 ± 4,160
		90	43,61 ± 6,957	41,47 ± 8,337	48,81 ± 12,594	41,53 ± 14,362	45,38 ± 12,747	-- ± --	-- ± --
	<b>Espermatozoides hiperactivos</b>	15	-- ± --	38,44 ± 8,863	41,17 ± 10,777	48,90 ± 7,225	39,63 ± 7,165	42,50 ± 9,708	42,50 ± 9,708
		30	46,07 ± 10,639	50,99 ± 14,336	34,17 ± 2,259	42,39 ± 9,774	55,66 ± 8,986	50,01 ± 23,342	-- ± --
		60	54,71 ± 9,499	33,71 ± 2,941	35,76 ± 10,778	35,91 ± 15,476	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		90	52,69 ± 10,308	39,42 ± 5,283	49,44 ± 11,680	46,22 ± 11,130	37,24 ± 3,429	-- ± --	-- ± --

Promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación de los parámetros de la trayectoria espermática, tras 90 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), a distinta concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Todas las concentraciones están indicadas en µM.

**Tabla S5.9** Variaciones en los componentes principales de la velocidad espermática debidas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Clase espermática		TIEMPO (min)	CAP control	NC Control	NC + 15 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 30 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 50 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 70 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 100 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
OSV 1	Espermatozoides progresivos	15	-0,76 ± 0,081	0,19 ± 0,049	0,05 ± 0,074	0,36 ± 0,064	0,85 ± 0,108	0,41 ± 0,104	0,41 ± 0,104
		30	-0,50 ± 0,035	0,16 ± 0,032	-0,24 ± 0,039	-0,21 ± 0,045	1,84 ± 0,076	-0,27 ± 0,065	-0,75 ± 0,079
		60	-0,77 ± 0,041	-0,30 ± 0,039	-0,36 ± 0,051	-0,78 ± 0,070	-0,49 ± 0,146	-0,81 ± 0,097	-0,87 ± 0,119
		90	-1,20 ± 0,059	-0,24 ± 0,048	-0,26 ± 0,048	-0,49 ± 0,078	1,42 ± 0,213	2,07 ± 1,009	-- ± --
	Espermatozoides intermedios	15	0,80 ± 0,399	1,55 ± 0,337	1,10 ± 0,630	2,40 ± 0,337	1,81 ± 0,399	2,40 ± 0,315	2,40 ± 0,315
		30	2,14 ± 0,103	0,78 ± 0,210	1,90 ± 0,190	1,83 ± 0,166	2,01 ± 0,269	1,31 ± 0,514	1,13 ± 0,630
		60	2,36 ± 0,134	1,64 ± 0,204	1,90 ± 0,514	1,88 ± 0,891	0,72 ± 0,630	1,94 ± 0,364	1,17 ± 0,630
		90	1,71 ± 0,269	1,10 ± 0,297	1,04 ± 0,194	0,48 ± 0,514	3,51 ± 0,630	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides hiperactivos	15	-- ± --	0,75 ± 0,892	0,68 ± 0,892	1,20 ± 0,515	0,25 ± 0,892	0,80 ± 0,631	0,80 ± 0,631
		30	0,33 ± 0,115	1,02 ± 0,230	0,16 ± 0,446	1,25 ± 0,195	1,61 ± 0,230	0,94 ± 0,631	-- ± --
		60	1,52 ± 0,119	1,05 ± 0,364	1,44 ± 0,892	0,26 ± 0,892	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		90	1,32 ± 0,399	0,55 ± 0,631	-0,17 ± 0,125	0,96 ± 0,446	1,11 ± 0,631	-- ± --	-- ± --
Clase espermática		TIEMPO (min)	CAP control	NC Control	NC + 15 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 30 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 50 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 70 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 100 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
OSV 2	Espermatozoides progresivos	15	0,04 ± 0,025	-0,22 ± 0,015	-0,24 ± 0,022	-0,05 ± 0,019	0,01 ± 0,033	-0,04 ± 0,032	-0,04 ± 0,032
		30	0,20 ± 0,011	-0,21 ± 0,010	-0,19 ± 0,012	-0,09 ± 0,014	-0,34 ± 0,023	0,07 ± 0,020	0,08 ± 0,024
		60	0,16 ± 0,013	-0,16 ± 0,012	-0,16 ± 0,016	-0,18 ± 0,021	-0,21 ± 0,044	0,11 ± 0,030	0,10 ± 0,036
		90	0,15 ± 0,018	-0,01 ± 0,015	-0,03 ± 0,015	-0,08 ± 0,024	-0,26 ± 0,065	-0,18 ± 0,307	-- ± --
	Espermatozoides intermedios	15	0,84 ± 0,065	0,69 ± 0,055	0,81 ± 0,102	0,75 ± 0,055	0,72 ± 0,065	0,67 ± 0,051	0,67 ± 0,051
		30	0,70 ± 0,017	0,85 ± 0,034	0,67 ± 0,031	0,68 ± 0,027	0,61 ± 0,044	0,70 ± 0,083	0,79 ± 0,102
		60	0,63 ± 0,022	0,75 ± 0,033	0,61 ± 0,083	0,72 ± 0,144	0,84 ± 0,102	0,76 ± 0,059	0,81 ± 0,102
		90	0,67 ± 0,044	0,77 ± 0,048	0,72 ± 0,032	0,82 ± 0,083	0,58 ± 0,102	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides hiperactivos	15	-- ± --	1,15 ± 0,578	0,95 ± 0,578	0,98 ± 0,335	1,14 ± 0,578	1,02 ± 0,410	1,02 ± 0,410
		30	1,50 ± 0,080	1,43 ± 0,152	1,16 ± 0,290	1,44 ± 0,129	1,28 ± 0,152	1,75 ± 0,410	-- ± --
		60	1,12 ± 0,083	1,35 ± 0,238	0,99 ± 0,578	1,25 ± 0,578	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		90	1,19 ± 0,260	1,13 ± 0,409	1,44 ± 0,086	1,15 ± 0,290	2,07 ± 0,410	-- ± --	-- ± --

Valor promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación de los componentes principales de la velocidad espermática, tras 90 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), a distinta concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Todas las concentraciones están indicadas en µM.

**Tabla S5.10** Variaciones en los componentes principales de la trayectoria espermática debidas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Clase espermática		TIEMPO (min)	CAP control	NC Control	NC + 15 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 30 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 50 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 70 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 100 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
OTS 1	Espermatozoides progresivos	15	-0,58 ± 0,081	0,60 ± 0,049	0,59 ± 0,074	0,22 ± 0,064	0,32 ± 0,108	0,22 ± 0,104	0,22 ± 0,104
		30	-0,83 ± 0,035	0,62 ± 0,032	0,29 ± 0,039	0,07 ± 0,045	2,34 ± 0,076	-0,30 ± 0,065	-0,61 ± 0,079
		60	-0,91 ± 0,041	0,21 ± 0,039	0,20 ± 0,051	-0,01 ± 0,070	0,15 ± 0,146	-0,73 ± 0,097	-0,73 ± 0,119
		90	-1,11 ± 0,059	-0,22 ± 0,048	-0,16 ± 0,048	-0,14 ± 0,078	1,69 ± 0,213	1,75 ± 1,009	-- ± --
	Espermatozoides intermedios	15	-1,52 ± 0,310	-1,11 ± 0,262	-1,70 ± 0,489	-0,84 ± 0,262	-0,98 ± 0,310	-0,55 ± 0,245	-0,55 ± 0,245
		30	-0,59 ± 0,080	-1,83 ± 0,163	-0,77 ± 0,148	-0,70 ± 0,129	-0,44 ± 0,209	-1,07 ± 0,400	-1,40 ± 0,489
		60	-0,33 ± 0,104	-1,05 ± 0,159	-0,99 ± 0,400	-1,34 ± 0,692	-1,67 ± 0,489	-1,11 ± 0,283	-1,69 ± 0,489
		90	-0,83 ± 0,209	-1,36 ± 0,231	-1,59 ± 0,151	-1,80 ± 0,400	0,76 ± 0,489	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides hiperactivos	15	-- ± --	-2,30 ± 0,804	-2,07 ± 0,804	-1,89 ± 0,464	-2,31 ± 0,804	-2,21 ± 0,569	-2,21 ± 0,569
		30	-2,66 ± 0,104	-2,20 ± 0,208	-2,41 ± 0,402	-2,05 ± 0,176	-1,66 ± 0,208	-2,30 ± 0,569	-- ± --
		60	-1,59 ± 0,108	-2,27 ± 0,328	-1,90 ± 0,804	-2,85 ± 0,804	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		90	-1,71 ± 0,360	-2,59 ± 0,569	-3,03 ± 0,113	-2,14 ± 0,402	-2,39 ± 0,569	-- ± --	-- ± --
Clase espermática		TIEMPO (min)	CAP control	NC Control	NC + 15 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 30 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 50 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 70 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NC + 100 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
OTS 2	Espermatozoides progresivos	15	-0,35 ± 0,050	-0,38 ± 0,030	-0,51 ± 0,046	-0,16 ± 0,039	0,13 ± 0,066	-0,19 ± 0,064	-0,19 ± 0,064
		30	0,05 ± 0,022	-0,25 ± 0,020	-0,51 ± 0,024	-0,31 ± 0,028	0,91 ± 0,047	-0,04 ± 0,040	-0,40 ± 0,049
		60	-0,13 ± 0,026	-0,40 ± 0,024	-0,52 ± 0,032	-0,69 ± 0,043	-0,57 ± 0,090	-0,38 ± 0,060	-0,41 ± 0,073
		90	-0,44 ± 0,037	-0,30 ± 0,029	-0,36 ± 0,029	-0,50 ± 0,048	0,76 ± 0,132	1,37 ± 0,624	-- ± --
	Espermatozoides intermedios	15	0,96 ± 0,287	0,94 ± 0,242	0,66 ± 0,453	1,25 ± 0,242	0,98 ± 0,287	1,43 ± 0,227	1,43 ± 0,227
		30	2,59 ± 0,074	0,75 ± 0,151	1,02 ± 0,137	1,96 ± 0,119	2,62 ± 0,193	1,79 ± 0,370	0,91 ± 0,453
		60	2,93 ± 0,097	1,15 ± 0,147	1,01 ± 0,370	1,05 ± 0,641	0,77 ± 0,453	1,14 ± 0,262	1,03 ± 0,453
		90	2,07 ± 0,193	1,11 ± 0,214	0,85 ± 0,140	0,56 ± 0,370	3,82 ± 0,453	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides hiperactivos	15	-- ± --	1,12 ± 0,772	1,15 ± 0,772	0,95 ± 0,446	1,45 ± 0,772	0,83 ± 0,546	0,83 ± 0,546
		30	1,84 ± 0,100	2,06 ± 0,199	1,07 ± 0,386	2,61 ± 0,169	3,05 ± 0,199	2,98 ± 0,546	-- ± --
		60	2,99 ± 0,103	1,84 ± 0,315	1,68 ± 0,772	0,58 ± 0,772	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		90	2,53 ± 0,345	0,76 ± 0,546	0,85 ± 0,108	1,86 ± 0,386	3,91 ± 0,546	-- ± --	-- ± --

Valor promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación de los componentes principales de la trayectoria espermática, tras 90 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), a distinta concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Todas las concentraciones están indicadas en µM.

Tabla S5.11 Variación de los parámetros de la velocidad espermática debidos a la Catalasa

MEDIO	Clase espermática	TIEMPO (min)	Control	132 U CAT/mL	300 U CAT/mL	3000 U CAT/mL	5294 U CAT/mL	8823 U CAT/mL
VAP	Espermatozoides progresivos	15	90,21 ± 33,405	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	91,31 ± 42,923	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	78,98 ± 34,288	131,93 ± 23,687	131,66 ± 23,787	-- ± --	118,22 ± 11,167	-- ± --
		90	78,58 ± 34,388	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	NC Espermatozoides intermedios	15	115,12 ± 34,357	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	97,50 ± 28,173	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	113,79 ± 30,370	126,14 ± 35,672	126,14 ± 35,672	-- ± --	129,90 ± 11,167	-- ± --
		90	106,16 ± 35,334	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides hiperactivos	15	95,46 ± 32,158	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	139,44 ± 49,307	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	100,30 ± 22,138	126,58 ± 18,419	125,89 ± 19,406	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		90	92,75 ± 11,602	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
VAP	Espermatozoides progresivos	15	66,12 ± 25,565	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	73,91 ± 37,444	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	70,67 ± 40,597	167,50 ± 34,250	167,71 ± 34,435	148,38 ± 37,941	157,43 ± 24,774	134,94 ± 19,066
		90	59,18 ± 25,389	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	CAP Espermatozoides intermedios	15	93,87 ± 27,988	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	146,72 ± 42,829	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	160,48 ± 45,851	150,41 ± 38,651	149,14 ± 38,912	168,21 ± 30,841	171,53 ± 22,827	140,23 ± 34,755
		90	127,51 ± 42,099	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides hiperactivos	30	113,89 ± 45,226	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	152,10 ± 31,432	145,62 ± 32,338	145,36 ± 33,053	143,03 ± 27,613	142,69 ± 26,921	145,72 ± 35,164
		90	144,34 ± 38,728	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --

Tabla S5.11 Cont. Variación de los parámetros de la velocidad espermática debidos a la Catalasa

MEDIO	Clase espermática	TIEMPO (min)	Control	132 U CAT/mL	300 U CAT/mL	3000 U CAT/mL	5294 U CAT/mL	8823 U CAT/mL	
VSL	Espermatozoides progresivos	15	74,29 ± 34,934	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		30	76,16 ± 43,759	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		60	63,16 ± 35,534	116,34 ± 26,064	116,05 ± 26,177	-- ± --	102,73 ± 15,002	-- ± --	
		90	60,38 ± 36,254	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	NC	Espermatozoides intermedios	15	84,43 ± 37,754	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			30	55,98 ± 25,163	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			60	87,14 ± 36,661	83,81 ± 30,409	83,81 ± 30,409	-- ± --	79,40 ± 15,002	-- ± --
			90	69,39 ± 36,520	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	VSL	Espermatozoides hiperactivos	15	44,11 ± 36,344	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			30	39,71 ± 20,093	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			60	48,47 ± 12,551	49,23 ± 24,289	48,52 ± 24,840	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			90	40,73 ± 11,911	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
CAP	Espermatozoides progresivos	15	47,25 ± 24,994	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		30	51,56 ± 35,008	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		60	48,48 ± 38,665	135,74 ± 37,534	135,99 ± 37,718	121,59 ± 40,752	132,61 ± 24,553	113,64 ± 17,866	
		90	37,41 ± 22,497	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	CAP	Espermatozoides intermedios	15	60,56 ± 32,575	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			30	100,28 ± 38,288	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			60	108,63 ± 49,211	104,12 ± 31,602	103,11 ± 31,850	121,41 ± 37,026	122,91 ± 29,681	105,83 ± 18,049
			90	89,53 ± 40,270	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	CAP	Espermatozoides hiperactivos	30	35,51 ± 27,964	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			60	51,99 ± 17,799	54,26 ± 22,748	54,10 ± 23,267	54,30 ± 22,251	57,91 ± 27,192	50,00 ± 28,257
			90	47,45 ± 20,637	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --

Tabla S5.11 Cont. Variación de los parámetros de la velocidad espermática debidos a la Catalasa

MEDIO	Clase espermática	TIEMPO (min)	Control	132 U CAT/mL	300 U CAT/mL	3000 U CAT/mL	5294 U CAT/mL	8823 U CAT/mL	
VCL	Espermatozoides progresivos	15	149,95 ± 52,243	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		30	151,11 ± 57,598	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		60	138,43 ± 56,828	219,12 ± 30,118	219,04 ± 30,334	-- ± --	214,59 ± 23,366	-- ± --	
		90	145,25 ± 54,305	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	NC	Espermatozoides intermedios	15	279,94 ± 73,797	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			30	235,62 ± 43,309	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			60	294,75 ± 65,979	286,99 ± 57,639	286,99 ± 57,639	-- ± --	280,90 ± 23,366	-- ± --
			90	254,96 ± 64,480	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides hiperactivos	15	248,36 ± 63,020	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		30	278,08 ± 78,859	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		60	296,10 ± 47,499	308,10 ± 34,491	304,69 ± 38,146	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		90	239,43 ± 61,527	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
CAP	Espermatozoides progresivos	15	128,33 ± 42,613	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		30	147,86 ± 62,052	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		60	137,10 ± 65,705	268,13 ± 50,274	268,23 ± 50,672	250,47 ± 59,288	270,65 ± 51,001	212,56 ± 34,265	
		90	119,13 ± 45,419	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	Espermatozoides intermedios	15	241,09 ± 50,705	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		30	319,38 ± 71,483	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		60	325,12 ± 84,057	324,46 ± 59,272	321,91 ± 59,917	351,57 ± 69,255	345,22 ± 46,817	334,97 ± 17,051	
		90	286,94 ± 63,937	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	Espermatozoides hiperactivos	30	245,02 ± 79,178	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		60	281,40 ± 54,142	317,10 ± 67,169	317,02 ± 68,674	298,02 ± 53,431	305,16 ± 66,599	312,63 ± 64,734	
		90	272,28 ± 35,572	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		90	272,28 ± 35,572	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	

Valor promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación de los parámetros de la velocidad espermática, tras 90 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), a distinta concentración de Catalasa (CAT).

Todas las concentraciones están indicadas en "Unidades catalíticas de Catalasa por mililitro".



Tabla S5.12 Variación de los parámetros de la trayectoria espermática debidos a la Catalasa

MEDIO	Clase espermática	TIEMPO (min)	Control	132 U CAT/mL	300 U CAT/mL	3000 U CAT/mL	5294 U CAT/mL	8823 U CAT/mL	
ALH	Espermatozoides progresivos	15	6,28 ± 1,629	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		30	6,56 ± 2,103	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		60	6,19 ± 1,714	11,36 ± 3,653	11,37 ± 3,675	-- ± --	11,91 ± 2,882	-- ± --	
		90	6,19 ± 1,537	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	NC	Espermatozoides intermedios	15	9,86 ± 2,005	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			30	9,31 ± 1,646	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			60	10,12 ± 1,552	18,14 ± 4,212	18,14 ± 4,212	-- ± --	20,00 ± 2,882	-- ± --
			90	9,75 ± 1,116	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	ALH	Espermatozoides hiperactivos	15	9,56 ± 1,817	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			30	12,12 ± 3,399	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			60	12,28 ± 4,661	20,12 ± 5,856	20,21 ± 6,129	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			90	9,52 ± 1,296	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
CAP	Espermatozoides progresivos	15	6,21 ± 1,759	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		30	7,49 ± 3,887	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		60	7,21 ± 3,823	13,50 ± 4,508	13,47 ± 4,537	14,00 ± 4,531	12,95 ± 3,853	11,82 ± 5,917	
		90	5,99 ± 2,394	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	CAP	Espermatozoides intermedios	15	8,38 ± 2,478	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			30	17,10 ± 5,213	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			60	20,16 ± 6,004	20,79 ± 4,246	20,67 ± 4,388	19,41 ± 4,025	17,90 ± 2,799	23,67 ± 4,413
			90	15,03 ± 4,846	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	CAP	Espermatozoides hiperactivos	30	13,57 ± 4,907	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			60	19,45 ± 5,412	20,82 ± 7,500	20,86 ± 7,681	19,25 ± 5,874	18,47 ± 6,622	19,24 ± 3,809
			90	14,83 ± 5,370	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			90	14,83 ± 5,370	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --

Tabla S5.12 Cont. Variación de los parámetros de la trayectoria espermática debidos a la Catalasa

MEDIO	Clase espermática	TIEMPO (min)	Control	132 U CAT/mL	300 U CAT/mL	3000 U CAT/mL	5294 U CAT/mL	8823 U CAT/mL
NC	Espermatozoides progresivos	15	6,89 ± 3,881	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	8,93 ± 9,148	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	6,90 ± 6,062	30,50 ± 6,166	30,46 ± 6,204	-- ± --	28,74 ± 5,669	-- ± --
		90	6,14 ± 4,297	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides intermedios	15	7,68 ± 5,566	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	4,91 ± 2,104	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	7,33 ± 3,433	21,04 ± 5,884	21,04 ± 5,884	-- ± --	28,20 ± 5,669	-- ± --
		90	8,95 ± 9,708	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides hiperactivos	15	6,00 ± 4,723	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	30,90 ± 22,452	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	13,21 ± 14,824	-- ± 12,370	37,66 ± 12,987	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		90	3,61 ± 0,547	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
BCF	Espermatozoides progresivos	15	5,31 ± 3,157	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	7,58 ± 8,173	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	6,74 ± 8,323	32,54 ± 8,648	32,59 ± 8,698	28,31 ± 9,092	36,80 ± 7,237	37,00 ± 7,749
		90	4,90 ± 4,578	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides intermedios	15	9,12 ± 3,875	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	22,50 ± 10,767	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	23,54 ± 9,354	23,23 ± 6,799	23,46 ± 6,937	28,02 ± 6,117	36,73 ± 6,308	20,03 ± 7,057
		90	15,70 ± 11,126	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides hiperactivos	30	15,99 ± 16,487	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	24,60 ± 10,489	31,51 ± 13,634	31,50 ± 13,958	35,22 ± 12,915	38,77 ± 7,320	41,79 ± 18,034
		90	28,63 ± 14,881	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --

Tabla S5.12 Cont. Variación de los parámetros de la trayectoria espermática debidos a la Catalasa

MEDIO	Clase espermática	TIEMPO (min)	Control	132 U CAT/mL	300 U CAT/mL	3000 U CAT/mL	5294 U CAT/mL	8823 U CAT/mL
NC	Espermatozoides progresivos	15	79,12 ± 13,700	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	79,75 ± 13,417	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	76,03 ± 15,305	87,78 ± 7,908	87,74 ± 7,967	-- ± --	86,63 ± 6,403	-- ± --
		90	72,86 ± 15,228	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides intermedios	15	70,71 ± 11,398	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	56,82 ± 15,746	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	74,05 ± 14,906	66,07 ± 11,186	66,07 ± 11,186	-- ± --	61,12 ± 6,403	-- ± --
		90	62,96 ± 19,011	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides hiperactivos	15	46,21 ± 12,549	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	29,45 ± 13,340	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	51,56 ± 18,073	38,96 ± 19,190	38,74 ± 20,065	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		90	43,45 ± 7,407	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
STR	Espermatozoides progresivos	15	68,94 ± 13,922	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	66,22 ± 15,482	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	64,16 ± 16,338	80,17 ± 10,065	80,21 ± 10,131	81,15 ± 9,495	84,13 ± 7,280	84,27 ± 6,857
		90	61,70 ± 15,078	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides intermedios	15	61,66 ± 15,874	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	66,64 ± 11,489	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	65,61 ± 14,689	69,00 ± 8,623	68,92 ± 8,940	71,00 ± 12,469	71,02 ± 11,148	76,57 ± 7,692
		90	67,51 ± 12,585	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides hiperactivos	30	30,58 ± 16,502	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	34,72 ± 11,618	38,87 ± 16,922	38,92 ± 17,339	38,84 ± 15,339	40,45 ± 17,174	34,37 ± 16,262
		90	35,22 ± 16,306	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --

Tabla S5.12 Cont. Variación de los parámetros de la trayectoria espermática debidos a la Catalasa

MEDIO	Clase espermática	TIEMPO (min)	Control	132 U CAT/mL	300 U CAT/mL	3000 U CAT/mL	5294 U CAT/mL	8823 U CAT/mL
NC	Espermatozoides progresivos	15	49,10 ± 15,789	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	49,01 ± 17,027	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	44,97 ± 16,490	53,79 ± 12,860	53,68 ± 12,894	-- ± --	48,68 ± 10,165	-- ± --
		90	40,20 ± 14,537	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides intermedios	15	29,01 ± 6,178	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	22,85 ± 5,696	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	28,42 ± 6,505	28,59 ± 4,825	28,59 ± 4,825	-- ± --	28,27 ± 10,165	-- ± --
		90	25,63 ± 7,331	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides hiperactivos	15	17,76 ± 10,983	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	14,15 ± 5,748	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	17,06 ± 5,475	16,11 ± 7,758	16,13 ± 8,051	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		90	16,93 ± 0,624	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
LIN	Espermatozoides progresivos	15	36,90 ± 14,384	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	33,36 ± 12,513	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	33,23 ± 13,142	50,66 ± 11,020	50,74 ± 11,075	49,75 ± 14,856	50,03 ± 10,480	54,31 ± 9,665
		90	31,45 ± 11,926	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides intermedios	15	23,87 ± 7,735	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	30,20 ± 6,527	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	32,02 ± 6,395	31,57 ± 4,342	31,51 ± 4,406	33,86 ± 4,891	35,14 ± 4,504	31,49 ± 4,092
		90	29,64 ± 8,171	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides hiperactivos	30	13,38 ± 6,987	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	18,44 ± 5,238	17,16 ± 6,156	17,12 ± 6,304	18,23 ± 6,427	19,31 ± 7,041	15,86 ± 7,962
		90	17,34 ± 6,179	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		90	17,34 ± 6,179	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --

Tabla S5.12 Cont. Variación de los parámetros de la trayectoria espermática debidos a la Catalasa

MEDIO	Clase espermática	TIEMPO (min)	Control	132 U CAT/mL	300 U CAT/mL	3000 U CAT/mL	5294 U CAT/mL	8823 U CAT/mL	
WOB	Espermatozoides progresivos	15	61,14 ± 13,712	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		30	60,26 ± 14,832	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		60	58,09 ± 14,181	60,84 ± 11,213	60,74 ± 11,229	-- ± --	55,75 ± 8,331	-- ± --	
		90	54,27 ± 12,373	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	NC	Espermatozoides intermedios	15	40,85 ± 4,013	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			30	41,31 ± 9,088	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			60	38,55 ± 4,910	43,84 ± 6,936	43,84 ± 6,936	-- ± --	46,24 ± 8,331	-- ± --
			90	41,47 ± 8,337	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides hiperactivos	15	38,44 ± 8,863	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	50,99 ± 14,336	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	33,71 ± 2,941	41,83 ± 8,894	42,22 ± 9,588	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		90	39,42 ± 5,283	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
CAP	Espermatozoides progresivos	15	52,63 ± 13,924	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		30	49,89 ± 11,548	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		60	51,22 ± 11,656	62,94 ± 9,318	63,00 ± 9,372	60,53 ± 12,536	59,18 ± 8,985	64,28 ± 8,933	
		90	50,81 ± 12,420	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	Espermatozoides intermedios	15	38,61 ± 6,359	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	45,46 ± 7,332	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	49,62 ± 7,520	46,16 ± 6,501	46,15 ± 6,677	48,26 ± 5,192	49,82 ± 3,593	41,70 ± 8,937	
		90	43,61 ± 6,957	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	Espermatozoides hiperactivos	30	46,07 ± 10,639	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	54,71 ± 9,499	46,99 ± 10,639	46,97 ± 10,880	48,79 ± 9,668	48,31 ± 11,754	48,30 ± 13,924	
		90	52,69 ± 10,308	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		90	52,69 ± 10,308	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --

Valor promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación de los parámetros de la trayectoria espermática, tras 90 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), a distinta concentración de Catalasa (CAT).

Todas las concentraciones están indicadas en "Unidades catalíticas de Catalasa por mililitro".

Tabla S5.13 Variación de los componentes principales de la velocidad espermática debidos a la Catalasa

MEDIO	Clase espermática	TIEMPO (min)	Control	132 U CAT/mL	300 U CAT/mL	3000 U CAT/mL	5294 U CAT/mL	8823 U CAT/mL	
OSV 1	Espermatozoides progresivos	15	0,19 ± 0,049	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		30	0,16 ± 0,032	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		60	-0,30 ± 0,039	1,80 ± 0,128	1,79 ± 0,129	-- ± --	1,56 ± 0,304	-- ± --	
		90	-0,24 ± 0,048	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	NC	Espermatozoides intermedios	15	1,55 ± 0,337	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			30	0,78 ± 0,210	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			60	1,64 ± 0,204	1,74 ± 0,297	1,74 ± 0,297	-- ± --	1,80 ± 0,891	-- ± --
			90	1,10 ± 0,297	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	OSV 1	Espermatozoides hiperactivos	15	0,75 ± 0,892	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			30	1,02 ± 0,230	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			60	1,05 ± 0,364	1,29 ± 0,230	1,24 ± 0,247	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			90	0,55 ± 0,631	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
OSV 1	Espermatozoides progresivos	15	-0,76 ± 0,081	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		30	-0,50 ± 0,035	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		60	-0,77 ± 0,041	2,45 ± 0,107	2,45 ± 0,108	2,10 ± 0,115	2,39 ± 0,096	1,78 ± 0,200	
		90	-1,20 ± 0,059	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	CAP	Espermatozoides intermedios	15	0,80 ± 0,399	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			30	2,14 ± 0,103	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			60	2,36 ± 0,134	2,31 ± 0,139	2,28 ± 0,145	2,69 ± 0,141	2,74 ± 0,230	2,34 ± 0,446
			90	1,71 ± 0,269	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	CAP	Espermatozoides hiperactivos	30	0,33 ± 0,115	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			60	1,52 ± 0,119	1,58 ± 0,112	1,56 ± 0,115	1,52 ± 0,102	1,50 ± 0,247	1,44 ± 0,297
			90	1,32 ± 0,399	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --

Tabla S5.13 Cont. Variación de los componentes principales de la velocidad espermática debidos a la Catalasa

MEDIO	Clase espermática	TIEMPO (min)	Control	132 U CAT/mL	300 U CAT/mL	3000 U CAT/mL	5294 U CAT/mL	8823 U CAT/mL
NC	Espermatozoides progresivos	15	-0,22 ± 0,015	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	-0,21 ± 0,010	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	-0,16 ± 0,012	-0,12 ± 0,039	-0,11 ± 0,039	± --	-0,02 ± 0,093	-- ± --
		90	-0,01 ± 0,015	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides intermedios	15	0,69 ± 0,055	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	0,85 ± 0,034	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	0,75 ± 0,033	0,69 ± 0,048	0,69 ± 0,048	-- ± --	0,69 ± 0,144	-- ± --
		90	0,77 ± 0,048	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides hiperactivos	15	1,15 ± 0,578	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	1,43 ± 0,152	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	1,35 ± 0,238	1,48 ± 0,152	1,49 ± 0,163	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		90	1,13 ± 0,409	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
OSV 2	Espermatozoides progresivos	15	0,04 ± 0,025	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	0,20 ± 0,011	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	0,16 ± 0,013	0,03 ± 0,033	0,03 ± 0,033	0,03 ± 0,035	0,05 ± 0,029	-0,17 ± 0,061
		90	0,15 ± 0,018	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides intermedios	15	0,84 ± 0,065	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	0,70 ± 0,017	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	0,63 ± 0,022	0,65 ± 0,023	0,65 ± 0,023	0,61 ± 0,023	0,56 ± 0,037	0,71 ± 0,072
		90	0,67 ± 0,044	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides hiperactivos	30	1,50 ± 0,080	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	1,12 ± 0,083	1,36 ± 0,078	1,36 ± 0,080	1,23 ± 0,072	1,32 ± 0,163	1,46 ± 0,195
		90	1,19 ± 0,260	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --

Valor promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación de los componentes principales de la velocidad espermática, tras 90 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), a distinta concentración de Catalasa (CAT).

Todas las concentraciones están indicadas en "Unidades catalíticas de Catalasa por mililitro".

Tabla S5.14 Variación de los componentes principales de la trayectoria espermática debidos a la Catalasa

MEDIO	Clase espermática	TIEMPO (min)	Control	132 U CAT/mL	300 U CAT/mL	3000 U CAT/mL	5294 U CAT/mL	8823 U CAT/mL	
OTS 1	Espermatozoides progresivos	15	0,60 ± 0,049	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		30	0,62 ± 0,032	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		60	0,21 ± 0,039	1,69 ± 0,128	1,68 ± 0,129	-- ± --	1,24 ± 0,304	-- ± --	
		90	-0,22 ± 0,048	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	NC Espermatozoides intermedios	15	-1,11 ± 0,262	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	-1,83 ± 0,163	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	-1,05 ± 0,159	-0,68 ± 0,231	-0,68 ± 0,231	-- ± --	-0,62 ± 0,692	-- ± --	
		90	-1,36 ± 0,231	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	Espermatozoides hiperactivos	15	-2,30 ± 0,804	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	-2,20 ± 0,208	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	-2,27 ± 0,328	-1,88 ± 0,208	-1,89 ± 0,223	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		90	-2,59 ± 0,569	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
CAP	Espermatozoides progresivos	15	-0,58 ± 0,081	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		30	-0,83 ± 0,035	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		60	-0,91 ± 0,041	1,37 ± 0,107	1,38 ± 0,108	1,27 ± 0,115	1,41 ± 0,096	1,73 ± 0,200	
		90	-1,11 ± 0,059	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	Espermatozoides intermedios	15	-1,52 ± 0,310	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	-0,59 ± 0,080	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	-0,33 ± 0,104	-0,36 ± 0,108	-0,36 ± 0,112	-0,06 ± 0,109	0,13 ± 0,179	-0,33 ± 0,346	
		90	-0,83 ± 0,209	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	Espermatozoides hiperactivos	30	-2,66 ± 0,104	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	-1,59 ± 0,108	-1,73 ± 0,101	-1,73 ± 0,104	-1,56 ± 0,092	-1,46 ± 0,223	-1,78 ± 0,268	
		90	-1,71 ± 0,360	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	



Tabla S5.14 Cont. Variación de los componentes principales de la trayectoria espermática debidos a la Catalasa

MEDIO	Clase espermática	TIEMPO (min)	Control	132 U CAT/mL	300 U CAT/mL	3000 U CAT/mL	5294 U CAT/mL	8823 U CAT/mL	
OTS 2	Espermatozoides progresivos	15	-0,38 ± 0,030	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		30	-0,25 ± 0,020	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		60	-0,40 ± 0,024	1,74 ± 0,079	1,74 ± 0,080	-- ± --	1,95 ± 0,188	-- ± --	
		90	-0,30 ± 0,029	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	NC	Espermatozoides intermedios	15	0,94 ± 0,242	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			30	0,75 ± 0,151	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
			60	1,15 ± 0,147	2,86 ± 0,214	2,86 ± 0,214	-- ± --	3,27 ± 0,641	-- ± --
			90	1,11 ± 0,214	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
	Espermatozoides hiperactivos	15	1,12 ± 0,772	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	2,06 ± 0,199	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	1,84 ± 0,315	3,60 ± 0,199	3,59 ± 0,214	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		90	0,76 ± 0,546	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
CAP	Espermatozoides progresivos	15	-0,35 ± 0,050	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		30	0,05 ± 0,022	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
		60	-0,13 ± 0,026	2,08 ± 0,066	2,08 ± 0,067	2,07 ± 0,071	2,16 ± 0,059	1,81 ± 0,124	
		90	-0,44 ± 0,037	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	Espermatozoides intermedios	15	0,96 ± 0,287	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		30	2,59 ± 0,074	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	2,93 ± 0,097	3,12 ± 0,100	3,11 ± 0,104	3,08 ± 0,101	3,10 ± 0,165	3,33 ± 0,320	
		90	2,07 ± 0,193	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	
	Espermatozoides hiperactivos	30	1,84 ± 0,100	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --
		60	2,99 ± 0,103	3,40 ± 0,097	3,40 ± 0,100	3,30 ± 0,089	3,33 ± 0,214	3,49 ± 0,257	
		90	2,53 ± 0,345	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --

Promedio ± S.E.M calculado por el SPSS, de la variación de los componentes principales de la velocidad espermática, tras 90 min de incubación en condiciones de supervivencia (NC) o capacitantes (CAP), a distinta concentración de Catalasa (CAT).

Todas las concentraciones están indicadas en "Unidades catalíticas de Catalasa por mililitro".