



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

TÍTULO DE LA TESIS

**Efecto del estado REDOX en la capacidad fertilizante de espermatozoides de
cerdo *Sus scrofa domesticus***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA

M. en BRA. Ernesto Rodríguez Tobón

Matricula: 2163802473

CODIRECTORAS DE TESIS

Dra. Edith Arenas Ríos

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

ASESOR

Dr. Humberto González Márquez

Ciudad de México, a 31 de agosto de 2021.

Reconocimientos

El presente trabajo fue realizado en los Laboratorios de “Morfofisiología y Bioquímica del Espermatozoide” y el de “Andrología” de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I) Departamento de Biología de la Reproducción y Ciencias de la Salud, bajo la codirección de la Dra. Edith Arenas Ríos y la Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana y como asesor el Dr. Humberto González Márquez.

Por otro lado, en el Departamento de Fisiología (Facultad de Veterinaria) de la Universidad de Murcia, España, bajo el asesoramiento del Dr. Francisco A. García Vázquez.

Le doy las gracias al Dr. Julio Cesar Chávez Zamora por la revisión del documento.

El alumno agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro (CVU / Beca): 570390 / 302854, N°: 458756, comprendió del periodo de 2016 / 2020.

El doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana es un posgrado multisede, Consolidado, orientado a investigación y pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del Conacyt con registro 001480

Jurado

El jurado designado por La Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis que presentó:

Ernesto Rodríguez Tobón

Fecha de aprobación de la tesis: 31 de agosto de 2021

JURADO:

Presidenta: **Dra. Edith Arenas Ríos**



Secretaria: **Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana**



Vocal 1: **Dr. Humberto González Márquez**



Vocal 2: **Dr. Francisco García Vázquez**



Vocal 3: **Dr. Julio César Chávez Zamora**



Dedicatorias

A mi abuela **Nelly García García**

Agradecimientos

A mi madre **Gisela**, por ser un ejemplo a seguir y base fundamental de todo lo que soy. Te amo madre, muchas gracias por todo.

A mi hermana **Nelly**, por ser mi compañera en este viaje que se llama vida y ser un ejemplo de fortaleza, así como de nobleza e inteligencia.

A mis abuelos **Nelly** y **Carlos**. Gracias por todo su apoyo.

A mi directora **Dra. Edith**, muchas gracias por todo. Gracias a usted este proyecto es una realidad. No tengo palabras para agradecerle todo lo que ha hecho por mí. Gracias.

A mi primo **Ahiezer** por ser cómplice principal de esto.

A mis amigos de la universidad, **Blanca**, **Lorena**, **Landa** y **Edwin**.

A mi codirectora **Dra. Reyna**, muchas gracias.

A mi asesor **Dr. Humberto**, muchas gracias.

A mi asesor externo **Dr. Francisco**, muchas gracias por todo, principalmente por tu confianza y ofrecerme tu amistad. Gracias a tu apoyo este proyecto es una realidad. Te espero con los brazos abiertos acá en México.

A mi asesor **Dr. Joaquín**, a usted le debo todo, fue el primero en brindarme su confianza y gracias a usted pude realizar uno de mis grandes sueños. Muchas gracias.

A mi amiga la **Dra. Silvia**, gracias también por confiar en mí y ser un ser humano tan genial.

A mi amiga la **Dra. Chiara “Chiarita”** gracias por todo, pero principalmente, por ser tan única, te quiero y te extraño mucho.

A mi amiga la **Mtra. Gaby**, gracias por todo, eres una persona maravillosa.

A mi amigo el **Mtro. Sergio**, muchas gracias por todas tus enseñanzas y consejos.

A mi amigo el **Químico Juan “Juanito”** gracias por el trabajo que realizas dentro del laboratorio, eres muy profesional y sobre todo un gran ser humano.

A mis compañeros y amigos **Eduardo**, **Javi**, **Adriana**, **Evelyn**, **Daniel**, **Jordana**, **Soledad**, **Cristina** y **Luis**.

A los académicos, **Dr. Salvador**, **Dra. Carmen**, **Dra. Raquel** y **Dra. Pilar**. Muchas gracias por su confianza y sus enseñanzas.

Resumen

Los espermatozoides, en el tracto reproductor de la hembra, experimentan cambios que se conocen como *capacitación espermática*, requisito para poder fecundar el ovocito; estos cambios están regulados por el sistema redox. Por otro lado, algunas tecnologías de reproducción asistida requieren la capacitación en condiciones *in vitro* y ha sido necesario el uso de antioxidantes, lo que puede modificar las condiciones de óxido-reducción del sistema. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de GSH como agente antioxidante durante la capacitación de espermatozoides de cerdo, evaluando la compartimentación del calcio, la fosforilación de tirosinas (Tyr-P), movilidad y viabilidad, integridad acrosomal, penetración, monospermia y eficiencia de la fecundación *in vitro* (FIV), así como el desarrollo embrionario, división, diámetro de los blastocistos y número de células. Se hicieron cuatro grupos experimentales con diferentes concentraciones de GSH (0, 0.5, 1 y 5 mM). Cuando se añadió 1 mM de GSH al medio, los espermatozoides capacitados (compartimentación del calcio) aumentaron después de 4 h; la localización de Tyr-P se modificó a 1 h y 4 h de incubación, dependiendo de la concentración de GSH. La movilidad espermática total y progresiva también aumentaron a las 4 h de incubación, pero solo en el grupo de 5 mM de GSH; la viabilidad, la integridad acrosomal y la Tyr-P, determinada por *Western blot*, no difieren entre los grupos experimentales. La adición de GSH durante la interacción de gametos aumentó las tasas de penetración, monospermia y eficiencia en el grupo de 1 mM de GSH en comparación con los demás. Sin embargo, el efecto de GSH no se observó en las tasas de división y el desarrollo a estadio de blastocisto en comparación con el control. En conclusión, el GSH modula la capacidad de los espermatozoides en función de su concentración y mejora la producción de FIV en 1 mM de GSH durante la interacción de gametos.

Palabras clave: Cerdos, ERO, estado redox, reproducción, producción animal,

Abstract

Sperm in the female's reproductive tract undergo changes known as sperm capacitation, a requirement to fertilize the oocyte; the redox system regulates these changes. On the other hand, some assisted reproductive technologies to require capacitation in vitro conditions; and the use of antioxidants has been necessary, which can modify the oxide-reduction conditions of the system. For this reason, the objective of the present study was to evaluate the effect of different concentrations of GSH as an antioxidant agent during the capacitation of boar sperm, evaluating calcium compartmentalization, tyrosine phosphorylation (Tyr-P); motility and viability; acrosomal integrity; penetration, monospermous and efficiency of in vitro fertilization (IVF), as well as embryonic development, division, the diameter of the blastocyst and number of cells. Four experimental groups were done with different concentrations of GSH (0, 0.5, 1, and 5 mM). When 1 mM GSH was added to the medium, the capacitation sperm (calcium compartmentalization) increased after 4 h; Tyr-P's localization was modified at 1 h and 4 h of incubation, depending on the concentration of GSH. Total and progressive sperm motility also increased at 4 h of incubation, but only in the 5 mM GSH group; the viability, the acrosome integrity, and the Tyr-P, determined by Western blot, did not differ between the experimental groups. The addition of GSH during gamete interaction increased penetration rates, monospermous, and efficiency in the 1 mM GSH group compared to the others. However, the effect of GSH was not observed on cleavage and blastocyst rates compared to the control. In conclusion, GSH modulates the capacity of sperm as a function of its concentration and enhances the production of IVF by 1 mM GSH during gamete interaction.

Keywords: Animal production, redox state, reproduction, ROS, pigs.

Índice general

Reconocimientos.....	i
Jurado	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos.....	iv
Resumen.....	v
Abstract	vi
Índice general.....	vii
Lista de figuras y tabla	ix
Lista de abreviaturas	xiii
1. Introducción.....	1
1.1. Capacitación espermática.....	1
2. Marco teórico	7
2.1. Glutati3n.....	7
2.2. Sistemas antioxidantes en espermatozoides	11
3. Justificaci3n.....	13
4. Pregunta de investigaci3n	15
5. Hip3tesis	15
6. Objetivo general	15
7. Objetivos espec3ficos	15
8. Material y m3todos.....	17
8.1. Reactivos	17
8.2. Material biol3gico	17
8.3. Capacitaci3n espermática <i>in vitro</i>	17
8.4. Estado de capacitaci3n de los espermatozoides	18
8.5. Compartimentaci3n de calcio mediante clortetraciclina (CTC).....	18
8.6. Fosforilaci3n de tirosina (Tyr-P)	19
8.6.1. Localizaci3n por inmunofluorescencia indirecta.....	19
8.6.2. Inmunodetecci3n en membrana (<i>Western Blot</i>).....	20
8.7. Análisis de la movilidad espermática	21

8.8.	Viabilidad e integridad acrosomal del espermatozoide	21
8.9.	Cuantificación de Grupos SH.....	22
8.10.	Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ERO).....	23
8.11.	Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos (MIV)	24
8.12.	Fecundación <i>in vitro</i> (FIV)	24
8.13.	Cultivo embrionario <i>in vitro</i>	25
8.14.	Análisis estadístico	26
9.	Resultados	28
9.1.	Capacitación espermática.....	28
9.1.1.	Compartimentación de calcio por CTC	28
9.1.2.	Inmunolocalización de la Tyr-P	30
9.1.3.	Tyr-P en el espermatozoide mediante inmunodetección en membrana (<i>Western blot</i>).....	32
9.2.	Movilidad espermática	34
9.3.	Integridad acrosomal y viabilidad espermática	36
9.4.	Grupos SH	37
9.5.	ERO	37
9.6.	Fecundación <i>in vitro</i> (FIV) y cultivo embrionario	38
10.	Discusión.....	41
11.	Conclusiones	46
12.	Perspectivas.....	47
13.	Referencias.....	48
14.	Productos derivados del trabajo de tesis doctoral	59
14.1.	Artículo de investigación.....	59
14.2.	Capítulo de libro	72

Lista de figuras y tabla

Figura 1. Tránsito del espermatozoide por el tracto reproductor femenino. A) Después de la eyaculación, una población heterogénea de espermatozoides alcanza el tracto reproductivo femenino. B) Sólo unos cuantos espermatozoides logran alcanzar el oviducto. C) Solo el espermatozoide capacitado correctamente puede fecundar al ovocito. Espermatozoide muerto (gris), dañado (rojo), normal (azul), hiperactivado (verde-azul) y capacitado (verde) (López-Úbeda y Matás, 2015).

Figura 2. Serie de acontecimientos que suceden durante la capacitación espermática. La albúmina remueve el colesterol de la membrana de los espermatozoides, lo anterior puede activar directamente los canales CatSper. La activación del cotransportador NBC (posiblemente activado por Ca^{2+} externo) aumenta los niveles de HCO_3^- activando a la sAC produciendo cAMP. Lo anterior activa el intercambiador de Na/H sNHE y junto con la activación del canal de protones (HV) (por eliminación de Zn^{2+}) aumentaría el pHi, de esta manera también se activan los canales CatSper y SLO3. El aumento general de Ca^{2+} favorece la glucólisis y la actividad del axonema, resultando en la hiperactivación. También existen otras maneras de movilizar Ca^{2+} como: PMCA4, SPCA1 y canales [receptor IP3 (IP3R), receptor de rianodina (RyR)]. También, el aumento de AMPc activa la PKA, favoreciendo la fosforilación de tirosina (Darszon et al., 2011).

Figura 3. A) estructura de aminoácidos del glutatión reducido (GSH). El GSH está constituido por tres aminoácidos: glutamato, cisteína y glicina. B) glutatión oxidado (GSSG). El GSSG está compuesto por dos moléculas de glutatión unidas por un puente disulfuro formado por las cisteínas (Martínez-Sámano et al., 2011).

Figura 4. Síntesis de Glutatión (GSH-Glutatión reducido). La enzima γ -glutamyl-cisteína utiliza glutamato y cisteína para formar el γ -glutamylcisteína, finalmente, la glicina en una reacción catalizada por la enzima glutatión sintetasa, forma GSH. GCLC=Glutamato Cisteína

Ligasa sub-unidad catalítica, GCLM=Glutamato Cisteína Ligasa sub-unidad reguladora (Lu, 2013).

Figura 5. Metabolismo del GSH, interacción enzimática y no enzimática para su formación. El producto final de la oxidación del GSH es GSH oxidado (GSSG) regenerado por la GR (glutación reductasa) esta transfiere electrones del NADPH al GSSG, reduciéndose a NADP+. El GSH extracelular y los conjugados S-glutación son sustratos para la enzima γ -glutamyl transpeptidasa (γ -GT) formando productos que serán hidrolizados, separando de esta manera a los aminoácidos para síntesis de *novo* de GSH (Martínez-Sámano *et al.*, 2011).

Figura 6. Capacitación espermática evaluada mediante la técnica de compartimentación del calcio (CTC). Los espermatozoides se incubaron en condiciones capacitantes durante 1 y 4 h en presencia de diferentes concentraciones de GSH (control 0, 0,5, 1 y 5 mM). a) Imágenes representativas de la compartimentación del calcio en los espermatozoides: (i) espermatozoides no capacitados: fluorescencia sobre toda la cabeza del espermatozoide y parte media del flagelo; (ii) espermatozoides capacitados: fluorescencia en el segmento ecuatorial y parte media del flagelo, pero sin fluorescencia en la región post-acrosomal de la cabeza. Barra de escala a 10 μ m. b) Efecto de concentraciones crecientes de GSH sobre la capacitación espermática a 1 y 4 h. Letras diferentes (a, A, B, C) indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo tiempo ($p < 0.05$) ($n = 17$). Los datos se expresan como media \pm SEM.

Figura 7. Inmunolocalización de Tyr-P en espermatozoides capacitados después de incubarlos en condiciones capacitantes con diferentes concentraciones de GSH. a) Patrones de Tyr-P en los espermatozoides: Patrón 1 (nivel bajo de Tyr-P), espermatozoides sin fluorescencia o solo en el acrosoma o solo en el flagelo, o ambos (acrosoma y flagelo); Patrón 2 (nivel medio de Tyr-P), fluorescencia en el segmento sub-ecuatorial sin tinción en el área del acrosoma y con o sin presencia de fluorescencia en el flagelo; Patrón 3 (alto nivel de Tyr-P),

espermatozoides con fluorescencia en el segmento sub-ecuatorial y acrosoma, con o sin fluorescencia en el flagelo. (i -iv) Imágenes de espermatozoides con diferentes patrones Tyr-P: (i) Patrones 1 y 3; (ii) Patrón 2; (iii-iv) Patrón 3. Barra de escala a 10 μm . b) y c) Niveles de Tyr-P en espermatozoides de cerdo a 1 y 4 h de incubación en medio TALP, respectivamente. Letras diferentes (a, b, c, d) indican diferencias estadísticas entre grupos experimentales en el mismo tipo de patrón ($p < 0.05$) ($n = 6$). Datos expresados como media \pm SEM.

Figura 8. Efecto del GSH durante la capacitación espermática y su efecto sobre la Tyr-P analizada por inmunodetección en membrana; a) y c) Western blot representativos de Tyr-P en espermatozoides capacitados a 1 y 4 h, respectivamente, utilizando diferentes concentraciones de GSH. Se usó β -tubulina como control de carga. Los recuadros rojos indican Tyr-P analizado en las bandas p32 y p18. Los gráficos b) y d) indican el número relativo de señal sobre la Tyr-P en p32 y p18, cuantificadas por el programa ImageQuant TL v. 8.1 (GE Healthcare, Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido) ($n = 4$). Datos expresados como media \pm SEM.

Figura 9. Evaluación de la integridad acrosomal (a) y viabilidad (b) de los espermatozoides después de la incubación en condiciones capacitantes (1 y 4 h) con diferentes concentraciones de GSH. La integridad acrosomal del espermatozoide ($n = 4$) y la viabilidad ($n = 6$) se evaluaron mediante PNA-FITC y yoduro de propidio respectivamente, bajo microscopía de fluorescencia. Datos expresados como media \pm SEM.

Figura 10. Efecto del GSH durante la interacción de gametos. a) Imágenes representativas para la evaluación de la FIV: (i) ovocito no penetrado (metafase II); (ii) ovocito penetrado (monospermico); (iii) ovocito penetrado (polispermico). S = espermatozoide, MP = placa metafásica, PB = cuerpo polar, P = pronúcleo. Barra de escala a 70 μm . b) Resultados que muestran el efecto de las diferentes concentraciones de GSH sobre la FIV. Letras diferentes en la misma columna (a, b) indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre grupos experimentales ($n = 5$). Los parámetros evaluados fueron: tasa de penetración (porcentaje de ovocitos

penetrados por al menos un espermatozoide), tasa de monospermia (porcentaje de ovocitos penetrados por un solo espermatozoide del total penetrado) y tasa de eficiencia de la FIV (porcentaje de ovocitos que fueron penetrados y monospérmicos del número total inseminado).

Figura 11. Efecto del GSH durante el cultivo de embriones in vitro. a) (i) Embrión en la etapa de 2 células, evaluado a las 42-44 h después de la inseminación (microscopio campo claro); (ii) Diámetro del blastocisto cuantificado mediante el programa Image J; (iii) blastocisto expandido y teñido con Hoechst 33342 (microscopio de fluorescencia). Barra de escala a 70 μm . b) Porcentaje de división y blastocistos totales. c) Diámetro de los blastocistos (μm); y d) número total de células por blastocisto. Número de cigotos evaluados por tratamientos: control (164); 0.5-GSH (172); 1-GSH (156); 5-GSH (165). El porcentaje de blastocistos se calculó a partir de embriones divididos. Letras diferentes (a, A, B, C), indica diferencias estadísticamente significativas entre grupos experimentales ($p < 0.05$) ($n = 5$).

Tabla 1. Evaluación de la movilidad de los espermatozoides por el sistema CASA a 1 (a) y 4 h (b) de incubación en condiciones capacitantes con diferentes concentraciones de GSH.

Lista de abreviaturas

AC	Adenilato Ciclasa.	GCLC	Glutamato Cisteína Ligasa, Subunidad Catalítica.
ACs	Adenilato Ciclasa Soluble.	GCLM	Glutamato Cisteína Ligasa,
ADN	Ácido desoxirribonucleico.	Glu	Ácido Glutámico.
AMP	– Monofosfato de Adenosina.	Gly	Glicina.
AMPc	– Monofosfato Cíclico de Adenosina.	GMPc	– Monofosfato Cíclico de Guanosina.
ARF	Factor de ADP-ribosilación.	GPCR	Receptor Acoplado a Proteínas G.
ATP	Adenosina Trifosfato.	GPX	Glutación Peroxidasa.
Ca²⁺	Ion Calcio.	GR	Glutación Reductasa.
CAT	Catalasa.	GSH	Glutación Reducido.
Cl⁻	Ion Cloro.	GSSG	Glutación Oxidado.
CO₂	Dióxido de Carbono.	GST	Glutación S-transferasa.
CSP	Complejo de Señales Proteínicas.	H⁺	Protón (Cation de Hidrógeno).
CTC	Clorotetraciclina.	H₂O₂	Peróxido de hidrógeno.
Cys	Cisteína.	HCO₃⁻	– Ion Bicarbonato.
DAG	Diacilglicerol.	HOCl	Ácido hipocloroso.
ERO	Especies Reactivas del Oxígeno.	Hv	Canal Específico de Protones.
FIV	Fecundación <i>in vitro</i> .	IP₃	Trifosfato de Inositol.
GCL	Glutamato Cisteína Ligasa.	K	Potasio.

LPA	Ácido Lisofosfatídico.	PKC	Proteína Quinasa C.
LPA-receptor	Receptor de Ácido Lisofosfatídico.	PLC	Fosfolipasa C.
MAE	Membrana Acrosomal Externa.	PLD	Fosfolipasa D.
MAI	Membrana Acrosomal Interna.	PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados.
MAPK	Proteína Quinasa Activada por Mitógenos.	RA	Reacción Acrosomal.
MIV	Maduración <i>in vitro</i>	RO•	Radical Alcoxilo.
Na⁺	Ion Sodio.	ROO•	Radical Peroxilo.
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato	ROOH	Hidroperóxidos orgánicos.
NBC	Cotransportador Na / Bicarbonato.	sNHE-	Na / Hidrógeno Intercambiador.
NO•	Óxido Nítrico.	SOD	Superóxido Dismutasa.
O²⁻	Anión superóxido.	TK	Tirosina Quinasa.
O₂	Oxígeno.	TP	Tirosina Fosfatasa.
OH•	Radical Hidroxilo.	TPe	Teca Perinuclear.
ONOO-	Peroxinitrito.	VPA	Vaina post Acrosomal.
PA	Ácido Fosfatídico.	WB	<i>Western Blot.</i>
PC	Fosfatidilcolina.	ZP	Zona Pelúcida.
PIP₂	Fosfatidilinositol Bifosfato.	γ-GT	γ-Glutamil Transpeptidasa.
PKA	Proteína Quinasa A.		

1. Introducción

El proceso de capacitación espermática en los mamíferos es un tema que se ha estudiado profundamente. Sin embargo, aún surgen preguntas sobre este fenómeno, específicamente en el cerdo por ser una especie de importancia económica, por lo tanto, se presenta la necesidad de mejorar la capacidad fertilizante, definiéndose como: la capacidad de los gametos para producir organismos viables, durante la reproducción sexual. Esta capacidad dependerá de que se lleven de manera adecuada, los procesos de diferenciación, maduración epididimaria, capacitación, interacción y penetración al ovocito, así como un desarrollo embrionario exitoso.

Por lo anterior, mejorar las tasas de reproducción basándose en el conocimiento de su fisiología, lo convierte en algo primordial. El presente proyecto aborda la relevancia del estrés oxidante durante la reproducción asistida, mediante técnicas de fecundación *in vitro*, con la finalidad de demostrar la importancia del estado redox en la biología de la reproducción.

1.1. Capacitación espermática

Los espermatozoides deben experimentar una serie de modificaciones denominadas en su conjunto capacitación espermática, después de la eyaculación y durante el tránsito de los espermatozoides a través del tracto reproductivo de la hembra (Figura 1) (Darszon *et al.*, 2011; Gervasi y Visconti, 2016; Chang, 1951). Estos cambios incluyen, la reorganización de las proteínas de membrana, así como de lípidos, para proporcionar fluidez a la membrana, y la activación de los canales de HCO_3^- y Ca^{2+} (Vadnais y Althouse, 2011; Gervasi y Visconti, 2016).

La entrada del HCO_3^- y Ca^{2+} estimula a la adenilato ciclasa soluble (ACs), la cual, producirá AMPc a partir de ATP, activando a la proteína quinasa A dependiente de AMPc (A-PKA), lo que incrementa la fosforilación de tirosina (Tyr-P), favoreciendo, la hiperactivación del espermatozoide y la reacción acrosomal (RA). Estos eventos están asociados con la remoción de colesterol de la membrana (Cross, 2004; Gervasi y Visconti, 2016) y la remodelación del citoesqueleto a través de la polimerización de actina (Breitbart y Finkelstein, 2018; Gadella *et al.*, 2008). Todos estos cambios permiten que los espermatozoides se unan a la zona pelúcida del ovocito e inicien la RA (Gadella *et al.*, 2008).

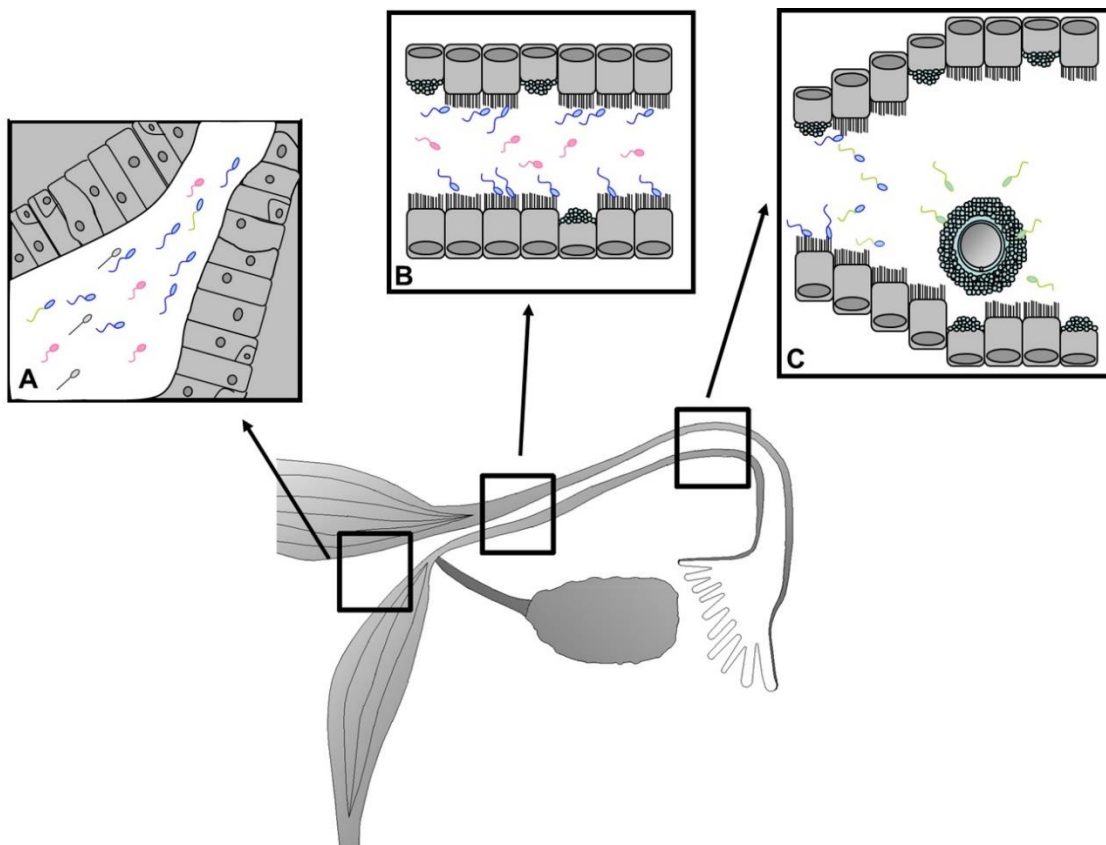


Figura 1. Tránsito del espermatozoide por el tracto reproductivo femenino. A) Después de la eyaculación, una población heterogénea de espermatozoides alcanza el tracto

reproductivo femenino. B) Solamente algunos espermatozoides logran alcanzar el oviducto. C) Únicamente el espermatozoide capacitado correctamente puede fecundar al ovocito. Espermatozoide muerto (gris), dañado (rojo), normal (azul), hiperactivado (verde-azul) y capacitado (verde) (López-Úbeda y Matás, 2015).

Los cambios descritos se dividen en rápidos y lentos revisado por (Visconti, 2009). Los rápidos se asocian con el aumento en la concentración de HCO_3^- y Ca^{2+} , estimulando de esta manera la vía de señalización mediada por ACs y PKA, la activación de canales iónicos y cotransportadores, así como un incremento en el pH intracelular. Por otro lado, los cambios lentos se presentan después, tanto *in vivo* como *in vitro*, pero igualmente regulado por HCO_3^- y Ca^{2+} , resultando en un aumento de la fosforilación de tirosinas (Tyr-P), hiperactivación del espermatozoide y preparándolo para otro proceso conocido como RA. Ambos eventos dependen de la presencia de aceptores de colesterol en la membrana.

La Tyr-P es uno de los eventos más característicos de la capacitación espermática (revisado por: (Aitken y Nixon, 2013). Sin embargo, los patrones y la distribución de la Tyr-P son diferentes entre especies (Ruiz-Díaz *et al.*, 2020). Por ejemplo, en el caso del porcino, la Tyr-P de la proteína p32 y p18 kDa del espermatozoide parece jugar un papel fundamental durante el proceso de capacitación (Dube *et al.*, 2005). Particularmente en el cerdo, se ha reportado que la p32 y 18 son proteínas que, al fosforilarse, favorecen la fecundación; la p32 es aún materia de estudio ya que su mecanismo no ha sido completamente dilucidado, se ha considerado una proteína de unión a proacrosina. Por otro lado, la localización de Tyr-P en el espermatozoide también es relevante, ya que al observar mayor fosforilación de tirosina en las diferentes regiones (acrosoma, región subecuatorial, pieza intermedia y flagelo) el espermatozoide tiene una mayor capacidad de fecundar (Dube *et al.*, 2005).

La hiperactivación (Claude Gagnon y Lamirande, 2006) es uno de los cambios más importantes de la capacitación. Su objetivo es que el espermatozoide tenga la fuerza necesaria para desprenderse de las criptas oviductales, penetrar la capa de células de la granulosa y la zona pelúcida del ovocito (Tulsiani-DRP., 2006). Para esto, los espermatozoides mantienen gradientes iónicos precisos a través de su membrana plasmática regulados por ATPasas dependientes de Na^+/K^+ y Ca^{2+} , así la alteración en la concentración iónica activa enzimas del acrosoma y enzimas relacionadas con los cambios en la movilidad (Gadella., 2008).

La hiperactivación del flagelo se produce debido a que el Ca^{2+} se une a proteínas fijadoras en el brazo externo de la dineína, la cual se encuentra en la parte interna del flagelo (Inaba-K., 2003). La dineína es responsable de la conversión de energía química a partir de la hidrólisis de ATP en energía mecánica para la movilidad (Claude Gagnon y Lamirande, 2006). El Ca^{2+} puede provenir de varios lugares, como reservas intracelulares, mediadas por los receptores de inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3) o la mitocondria, y de manera extracelular por sistemas de transporte Na^+/H^+ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Darszon *et al.*, 2001). La remoción del colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide también puede activar directamente canales iónicos, aumentando la concentración de Ca^{2+} intracelular (Darszon *et al.*, 2011; Travis y Kopf, 2002; Gadella *et al.*, 2008).

De igual forma, se ha descrito la posible participación de un cotransportador (NBC, por sus siglas en inglés ***Na⁺/Bicarbonate Cotransporter***) (Demarco *et al.*, 2003) posiblemente activado por el Ca^{2+} extracelular, el cual favorece la entrada de Na^+ y HCO_3^- , donde este último resulta fundamental para la activación de la enzima adenilato ciclasa soluble (ACs), la cual se encuentra soluble en el citosol, de esta manera aumenta la producción de AMPc (Darszon *et al.*, 2011).

Así mismo, se ha reportado un canal (sNHE, por sus siglas en inglés *Na⁺/Hydrogen Exchanger*) (Wang *et al.*, 2003) que funciona intercambiando Na⁺ por H⁺ que, en conjunto con un canal específico de protones (H_v) (Lishko *et al.*, 2010) regulado por el Zn²⁺, elevan el pH intracelular (de 6.0 a 7.5); dicho aumento es relevante ya que puede activar canales iónicos (Ca²⁺, Cl⁻ y K⁺) favoreciendo la hiperactivación. Al mismo tiempo, el aumento en los niveles de AMPc activa a la PKA, estimulando la proteína tirosina quinasa TK, y ésta a su vez, la fosforilación de tirosinas, proceso que se asocia con la capacitación espermática (Figura 2) (Darszon *et al.*, 2011).

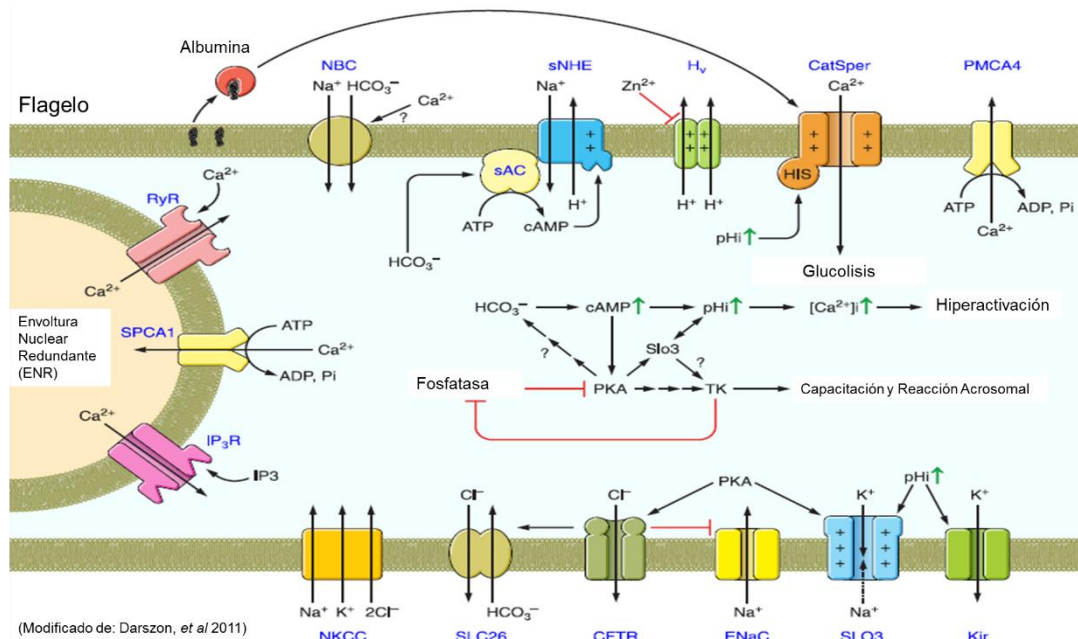


Figura 2. Serie de acontecimientos que suceden durante la capacitación espermática. La albúmina remueve el colesterol de la membrana de los espermatozoides, lo anterior puede activar directamente los canales CatSper. La activación del cotransportador NBC (posiblemente activado por Ca²⁺ externo) aumenta los niveles de HCO₃⁻ activando a la sAC produciendo cAMP. Lo anterior activa el intercambiador de Na/H sNHE y junto con la activación del canal de protones (HV) (por eliminación de Zn²⁺) aumentaría el pHi, de esta manera también se activan los canales CatSper y SLO3. El aumento general de Ca²⁺ favorece la glucólisis y la actividad del axonema, resultando en la hiperactivación. También

existen otras maneras de movilizar Ca^{2+} como: PMCA4, SPCA1 y canales [receptor IP3 (IP3R), receptor de rianodina (RyR)]. También, el aumento de AMPc activa la PKA, favoreciendo la fosforilación de tirosina (Darszon *et al.*, 2011).

La energía de los espermatozoides es producida en la mitocondria por respiración aerobia y en el flagelo por glucólisis y ciclo de las pentosas (Visconti, 2012). Estos procesos involucran reacciones de óxido-reducción, por lo que los mecanismos de defensa contra la oxidación deben estar en equilibrio. Aunque las especies reactivas de oxígeno (ERO) son esenciales para la capacitación espermática (Ford, 2004; Aitken, 2017), se sabe que un exceso de ERO es dañino, ya que se compromete la funcionalidad del espermatozoide al someterlo a estrés oxidante (Ford, 2004; Guthrie y Welch, 2012).

Debido a la vulnerabilidad de los espermatozoides frente al estrés oxidante (Pintus *et al.*, 2018), su funcionamiento correcto requiere niveles de ERO que estimulen las vías de señalización directamente asociadas con la capacitación (Guthrie y Welch, 2012; Ford, 2004; Aitken y Drevet, 2020). Por ejemplo, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), resultante de la dismutación del anión superóxido, puede aumentar la Tyr-P inhibiendo a la enzima tirosina fosfatasa (TP). Esta última, tiene un residuo de cisteína que debe permanecer reducido para preservar su actividad. Entonces, cuando H_2O_2 está presente la enzima TP se oxida y su actividad se inhibe, incrementando la Tyr-P (Aitken y Bennetts, 2006; Awda *et al.*, 2009; Ford, 2004).

Cabe mencionar que durante la preparación para la fecundación *in vitro* (FIV), los espermatozoides están expuestos a condiciones de oxidación como: la luz, el aumento en las concentraciones de oxígeno, cambios en el pH y temperatura, además de la eliminación de plasma seminal, la cual es una fuente de antioxidantes (Barranco *et al.*, 2015; Martín-Hidalgo *et al.*, 2019; Arias *et al.*, 2017; Dominguez-Rebolledo *et al.*, 2009).

2. Marco teórico

2.1. Glutación

Desde el punto de vista químico, el glutati3n (GSH = L- γ -glutamil-cisteinil-glicina) es un compuesto de bajo peso molecular con un grupo sulfhidrilo (-SH). Se trata de un tripéptido (Figura 3) formado por los aminoácidos: ácido glutámico, glicina y cisteína, el cual, juega un papel decisivo en el mecanismo de defensa intracelular frente al estrés oxidante (Sarrasague *et al.*, 2006).

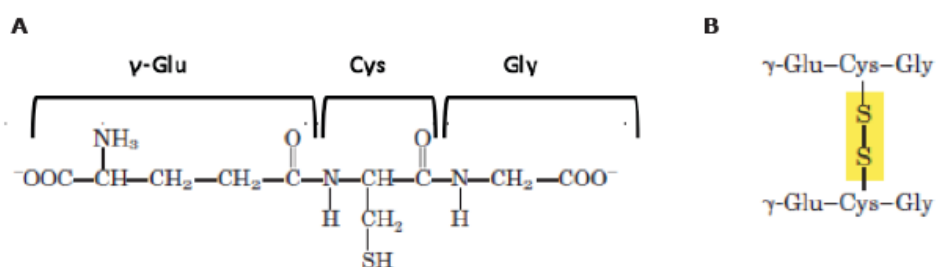


Figura 3. A) estructura de aminoácidos del glutati3n reducido (GSH). El GSH está constituido por tres aminoácidos: glutamato, cisteína y glicina. B) glutati3n oxidado (GSSG). El GSSG está compuesto por dos moléculas de glutati3n unidas por un puente disulfuro formado por las cisteínas (Martínez-Sámano *et al.*, 2011).

La concentración de GSH oscila en el rango de 1 a 11 mM en células de mamíferos en general (García-Giménez *et al.*, 2013; Lu, 2013). Por otro lado, estudios más especializados en células espermáticas han reportado una concentración de: $3.84 \pm 0.21 \text{ nM}/10^8$ espermatozoides en la especie porcina (Gadea *et al.*, 2004) y de: $4.47 \pm 0.46 \text{ nM}/10^8$ espermatozoides en humano (Gadea *et al.*, 2011).

Del mismo modo, se ha informado que la concentración citosólica de GSH en células de mamíferos representa entre el 70 y el 85%, mientras que la concentración nuclear y

mitocondrial representan entre el 15 y el 30% restante. De igual manera, han reportado un pequeño porcentaje en retículo endoplásmico (García-Giménez *et al.*, 2013; Lu, 2013).

El GSH tiene importantes funciones como antioxidante, siendo parte fundamental de la detoxificación de xenobióticos, así como para el almacenamiento y transporte de cisteína (Martínez-Sámano *et al.*, 2011). Una función importante del GSH es mantener el potencial de óxido-reducción de la célula, ya que mantiene en estado reducido los grupos tiol de las proteínas, y así permite la generación de diversas cascadas de señalización intracelular; un ejemplo de esto es la PKC y PKA (Martínez-Sámano *et al.*, 2011).

El GSH es sintetizado en el citoplasma de las células por la acción consecutiva de dos enzimas: γ -glutamil-cisteína (γ -GluCys) sintetasa (también conocida como glutamato cisteína ligasa, GCL por sus siglas en inglés) y la enzima glutatión sintetasa. La primera utiliza glutamato y cisteína como sustrato para formar el dipéptido γ -glutamilcisteína, dicha enzima es considerada como un paso limitante en la síntesis de GSH, la segunda enzima utiliza la glicina para formar GSH (Lu, 2013). Posteriormente, el trifosfato de adenosina (ATP) es donador de energía para ambas enzimas. Finalmente, las concentraciones intracelulares de GSH son reguladas por la inhibición de la GCL, de esta manera existe un equilibrio celular entre la síntesis y el consumo (Figura 4) (Sarrasague *et al.*, 2006; Martínez-Sámano *et al.*, 2011; Lu, 2013).

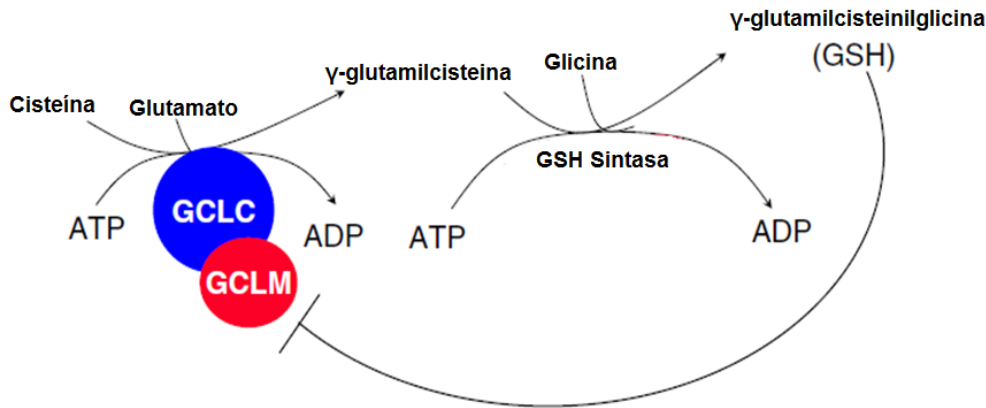


Figura 4. Síntesis de Glutati6n (GSH-Glutati6n reducido). La enzima γ -glutamil-cisteina utiliza glutamato y cisteina para formar el γ -glutamilcisteina, finalmente, la glicina en una reacci6n catalizada por la glutati6n sintetasa, forma GSH. GCLC=Glutamato Cisteina Ligasa sub-unidad catalítica, GCLM=Glutamato Cisteina Ligasa sub-unidad reguladora (Lu, 2013).

Durante la destoxificaci6n de las ERO, el GSH est1 involucrado en dos tipos de reacciones: la interacci6n no enzim1tica con radicales como el O_2^- , 6xido n1trico y OH^\bullet . Tambi6n, participa proporcionando un electr6n para la reducci6n de per6xidos en la reacci6n catalizada por la GPx (Fern1ndez-Checa, 2008). El producto final de la oxidaci6n del GSH es glutati6n oxidado (GSSG) regenerado por la GR, enzima que transfiere electrones del NADPH al GSSG, reduci6ndose a $NADP^+$. Durante las reacciones catalizadas por la GPx y la GR, el GSH no es degradado ya que es reciclado y as1 puede ser utilizado cuando se requiera (Figura 5) (Ralf *et al.*, 2000).

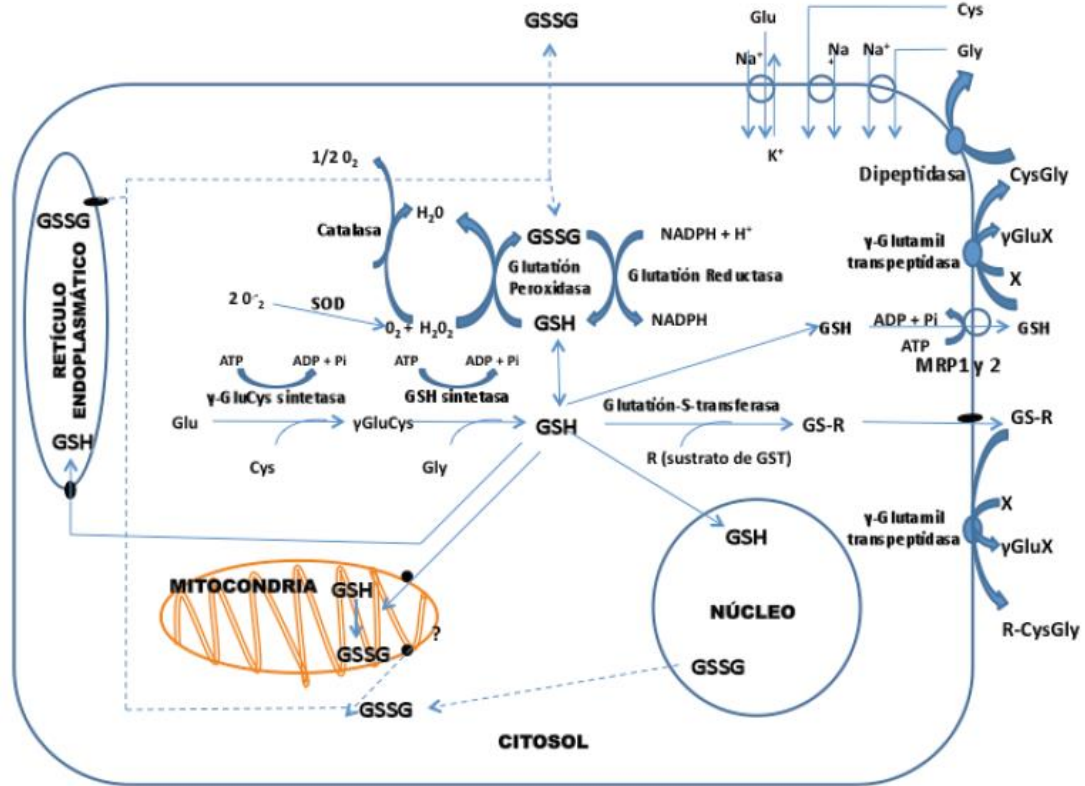


Figura 5. Metabolismo del GSH, interacción enzimática y no enzimática para su formación. El producto final de la oxidación del GSH es GSH oxidado (GSSG) regenerado por la GR (glutación reductasa) ésta transfiere electrones del NADPH al GSSG, reduciéndose a NADP⁺. El GSH extracelular y los conjugados S-glutión son sustratos para la enzima γ -glutamilo transpeptidasa (γ -GT) formando productos que serán hidrolizados, separando de esta manera a los aminoácidos para síntesis de *ново* de GSH (Martínez-Sámano *et al.*, 2011).

Por otro lado, durante la generación de conjugados S-glutión por la glutación S-transferasa (GST) o por la liberación de GSH por las células, el nivel total de GSH disminuye dentro de las células, por lo tanto, el GSH utilizado para esos procesos tiene que ser remplazado por síntesis de *ново* (Figura 5) (Ralf *et al.*, 2000).

El GSH extracelular y los conjugados S-glutión son sustratos para la enzima γ -glutamilo transpeptidasa (γ -GT), la cual cataliza la transferencia del γ -glutamilo del GSH (o de los

conjugados S-glutión) a una molécula aceptora y, por lo tanto, genera el dipéptido cisteinilglicina (o el conjugado S-cisteinilglicina) y el γ -glutamilo conjugado. El dipéptido cisteinilglicina puede ser hidrolizado por ectopeptidasas de cisteína y glicina, aminoácidos que posteriormente pueden ser transportados por la célula a través de transportadores específicos y participar en la síntesis de *nov*o de GSH (Ralf *et al.*, 2000).

2.2. Sistemas antioxidantes en espermatozoides

El sistema de defensa antioxidante en los espermatozoides se divide en enzimáticos y no enzimáticos. En el primero, encontramos a las enzimas: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX), y en el segundo, el glutatión reducido (GSH) (Quiroz y Bahena, 2008; Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2008; Peraza-Reyes, 2008; Thannickal y Fanburg, 2000), peroxirredoxina (PRDX), tioredoxina (TRX), y tioredoxina reductasa (TRD) (O'Flaherty, 2018). Particularmente, la GPX es una de las enzimas antioxidantes responsables de la metabolización de H_2O_2 , usando GSH como sustrato, para producir glutatión oxidado (GSSG), que se reduce posteriormente por la enzima glutatión reductasa (GR) para permitir que el GSH vuelva a tener su efecto antioxidante, este proceso es conocido como ciclo redox del glutatión (Aitken y Roman, 2008; Fernández-Checa, 2008). En las tecnologías de reproducción asistida (ART), la preparación *in vitro* del espermatozoide es esencial para una fecundación adecuada, el desarrollo del embrión y las tasas de descendencia exitosas (Navarrete *et al.*, 2019).

Se sabe que el estrés oxidante juega un papel clave en la función espermática, durante la preparación de las muestras en las investigaciones, se ha demostrado que la adición de GSH en algunas situaciones, tales como, congelación-descongelación del espermatozoide mejora la función espermática en varias especies, incluidos los cerdos (Gadea *et al.*, 2005; Baishya *et al.*, 2018; Giaretta *et al.*, 2015; Yeste *et al.*, 2014; Estrada *et al.*, 2014; Yeste *et al.*, 2013), cabras (Gadea *et al.*, 2013), carneros (Mata-Campuzano *et al.*, 2015; Silva *et al.*,

2011), bovinos (Shah *et al.*, 2017; Olfati Karaji *et al.*, 2014; Perumal *et al.*, 2011; Gadea *et al.*, 2008), y humanos (Ghorbani *et al.*, 2016; Gadea *et al.*, 2011). Sin embargo, se ha observado que la adición de concentraciones altas de GSH puede inhibir procesos importantes como la capacitación espermática (Gadea *et al.*, 2005).

3. Justificación

El GSH se ha usado en espermatozoides de varias especies para mejorar su calidad durante su conservación a largo plazo como es la congelación (Gadea *et al.*, 2005). Se ha reportado que en espermatozoides de humano y cerdo, la congelación disminuye las concentraciones de GSH (Gadea *et al.*, 2004; Gadea *et al.*, 2011), lo que pudiera ser la causa de la disminución de la calidad de los espermatozoides criopreservados.

Gadea y col. (2005) encontraron en cerdo, que el GSH a 5mM (una concentración alta) en medios de descongelación, disminuye la viabilidad de espermatozoides capacitados, tanto respecto del control como de concentraciones más bajas (1mM); en contraste, más espermatozoides penetran al ovocito a concentraciones de 5mM provocando polispermia (Gadea *et al.*, 2005).

Por otro lado, al determinar la calidad espermática de espermatozoides de cerdos en medios de almacenamiento a 17°C con GSH, se observó un aumento en la movilidad y de la integridad de la membrana plasmática, así como una disminución de malondialdehído (MDA) y de H₂O₂ con 1 mM de GSH durante 5-6 días de almacenamiento (Zhang *et al.*, 2016).

De igual forma, se estudió el efecto del GSH durante la FIV y el desarrollo embrionario. Sun y colaboradores (Sun *et al.*, 2015) reportaron en bovino que con 1, 3 y 5 mM de GSH, la calidad del embrión y la tasa de blastocistos mejoró. Específicamente, la tasa de blastocistos subió al 51% y los embriones con mejor calidad se desarrollaron con 3 mM de GSH. En otro estudio se demostró un aumentó en la tasa de FIV y la calidad del embrión,

así como una disminución de ERO en cigotos y embriones con 3 mM de GSH (Li *et al.*, 2019).

Se ha determinado que el GSH se incrementa en ovocitos de manera significativa durante la maduración *in vitro* (MIV), al agregar cisteína a 0.6 mM (este aminoácido es parte del tripéptido que forma al GSH (Lu, 2013). Se ha descrito en mamíferos, que durante la MIV ocurre el reinicio de la meiosis y para este proceso es necesaria la participación de ERO (Tiwari *et al.*, 2016). Lo anterior, aumenta la tasa de división y número de blastocistos, demostrando que la síntesis de GSH podría ser un factor crítico para el desarrollo adecuado de los embriones (Furnus *et al.*, 2008).

Lo anterior, muestra la importancia del estado redox en el espermatozoide durante el proceso de capacitación espermática, por lo que el GSH pudiera estar participando en la regulación de dicho proceso.

4. Pregunta de investigación

¿Cuál es el efecto de la modificación del estado redox en la capacitación espermática, fecundación *in vitro* y desarrollo embrionario?

5. Hipótesis

El estado redox interviene en la fisiología del espermatozoide. Entonces, si se varía la concentración de GSH en el medio capacitante, se deberá encontrar una concentración óptima que permita modular la capacitación espermática, así como la fecundación *in vitro* y el desarrollo embrionario.

6. Objetivo general

Determinar cómo los cambios en el estado redox del espermatozoide a través de la adición de diferentes concentraciones de GSH al medio capacitante, influyen en la capacitación espermática, fecundación *in vitro* y desarrollo embrionario en la especie porcina.

7. Objetivos específicos

Determinar el efecto del estado redox modificado por la concentración de GSH en espermatozoides durante:

- Capacitación espermática (analizando la compartimentación del calcio, Tyr-P, movilidad de los espermatozoides, integridad acrosomal y viabilidad, formación de grupos tiol (SH) y ERO).
- Fecundación *in vitro* (penetración, monospermia y eficiencia).

- Desarrollo embrionario (tasas de división y blastocistos, número total de células por blastocisto y diámetro).

8. Material y métodos

8.1. Reactivos

Los reactivos que se utilizaron en el estudio se adquirieron (a menos que se indique lo contrario) de Sigma-Aldrich®.

8.2. Material biológico

Para este estudio, se utilizó la fracción rica del eyaculado, proveniente de cerdos con fertilidad comprobada. Se obtuvieron un total de 37 eyaculados mediante masturbación (técnica de mano enguantada) de la empresa CEFU, SA (Alhama de Murcia, Murcia, España). Las muestras se transportaron al laboratorio a 17°C, protegidas de la luz. Los criterios de inclusión establecidos para el uso de los eyaculados fueron: movilidad total > 70%, espermatozoides viables > 90% y morfoanomalías ≤10%.

Los ovarios se obtuvieron de cerdas prepúberes (El Pozo Alimentación SA, Alhama de Murcia, Murcia, España) y se transportaron al laboratorio en solución salina estéril a 38.5°C. A su llegada, se lavaron con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB; 1%) a 38.5°C.

8.3. Capacitación espermática *in vitro*

Los espermatozoides se centrifugaron mediante un gradiente de Percoll® (Pharmacia, Uppsala, Suecia) de dos fases (90 y 45%) preparado con BTS (*Beltville Thawing Solution*) Acromax® a temperatura ambiente. Se agregaron 2 mL de cada solución (primero, Percoll al 90%, segundo al 45%, teniendo cuidado de no mezclar las fases) a un tubo cónico de 10 mL. Finalmente, se agregaron 500 µL de semen a la parte superior del gradiente y se centrifugaron sin freno a 700 g durante 30 min a temperatura ambiente (Matás *et al.*, 2011).

Para la capacitación espermática *in vitro*, la concentración de espermatozoides se ajustó a 8×10^6 espermatozoides / mL en cada grupo experimental. Las muestras se incubaron hasta 4 h a 38.5°C y 5% de CO₂ en medio capacitante TALP (114.06 mM de NaCl, 3.20 mM de KCl, 0.50 mM de MgCl₂•6H₂O, 10 mM de lactato de sodio, 0.35 mM de NaH₂PO₄•H₂O, 5 mM glucosa, 25.07 mM de NaHCO₃, 2 mM de cafeína, 8 mM de lactato de calcio•5H₂O, 1 mg/ml de PVA, 0.17 mM de kanamicina, 0.003 mM de rojo fenol), suplementado con 6 mg/ml de BSA y 0.2 mM de piruvato de sodio. El medio se equilibró previamente durante 3 h a 38.5°C / 5% CO₂ (Rath *et al.*, 1999).

Dependiendo del grupo experimental, el medio TALP se suplementó con 0.5, 1.0, o 5.0 mM de GSH concentración final (0.5-GSH, 1-GSH, 5-GSH, respectivamente) (L- glutatión reducido). El control no contenía GSH (0-GSH). Las evaluaciones de los espermatozoides se realizaron después de 1 y 4 h de incubación en condiciones capacitantes.

8.4. Estado de capacitación de los espermatozoides

Para determinar el estado de los espermatozoides se analizaron los siguientes valores: Compartimentación del calcio (tinción de fluorescencia con CTC (clortetraciclina, Tyr-P (inmunofluorescencia y Western blot), la movilidad, la integridad del acrosoma y la viabilidad.

8.5. Compartimentación de calcio mediante clortetraciclina (CTC)

Se realizó la tinción con CTC basándonos en lo descrito por (Maxwell y Johnson, 1997). Los espermatozoides se resuspendieron en paraformaldehído al 12% y se mezclaron en una solución de CTC (CTC 750 mM en NaCl 130 mM, cisteína 5 mM y Tris-HCl 20 mM, pH 7.8. Se realizaron frotis en portaobjetos y se montaron con medio de montaje Dako (Agilent®, USA). Las muestras se observaron bajo microscopía de fluorescencia (Olympus

BX51, Japón, 495/520 nm) contando al menos 200 células por grupo. La clasificación de los espermatozoides se realizó utilizando los siguientes criterios (Figura 6a): (i) espermatozoides no capacitados: fluorescencia en toda la cabeza del espermatozoide y flagelo; y (ii) espermatozoides capacitados: fluorescencia en el segmento ecuatorial superior y en la pieza media (Green *et al.*, 1994; Jiménez *et al.*, 2003; Ded *et al.*, 2010; Cervantes *et al.*, 2008; Ded *et al.*, 2019).

8.6. Fosforilación de tirosina (Tyr-P)

8.6.1. Localización por inmunofluorescencia indirecta

Las muestras de semen se centrifugaron y lavaron con PBS (buffer de solución salina) durante 10 min a 270 g a temperatura ambiente (Luño *et al.*, 2013). Los espermatozoides se fijaron en paraformaldehído al 2% durante 60 min a 4°C y luego se centrifugaron en las condiciones mencionadas anteriormente. Seguidamente, las preparaciones se bloquearon con BSA-PBS al 2% y se dejaron incubar durante la noche a 4°C en una cámara húmeda (Luño *et al.*, 2013). Posteriormente, los espermatozoides se centrifugaron durante 10 min a 270 g a 4°C y se resuspendieron en PBS. Se realizaron frotis en portaobjetos y se dejaron secar en una termo-placa a 38.5°C. Después, los portaobjetos se incubaron durante 1 h a 4°C con un anticuerpo monoclonal anti-Tyr-P, como anticuerpo primario (4G10, Millipore, Temecula, CA, EE. UU.) a una dilución de 1:300 en BSA al 0.1% en PBS. Posteriormente, los portaobjetos se lavaron con PBS (3 x 5 min) y se incubaron durante 1 h a 4°C con el anticuerpo secundario (cabra/anti-ratón-FITC Bio-Rad Laboratorio Madrid, España) a una dilución de 1:400 en BSA al 0.1%. Posteriormente, se lavaron con PBS (3 x 5 min) y se montaron como previamente se ha descrito (Luño *et al.*, 2013). Los espermatozoides se evaluaron bajo microscopía de fluorescencia (Leica® DM4000 Led, Wetzlar, Alemania, 495/520 nm) contando al menos 200 células por grupo.

La localización de la fosforilación de tirosina, se identificó según lo descrito previamente por (Luño *et al.*, 2013) (Figura 7a), en donde regionalizaron el tracto reproductor femenino, obteniendo espermatozoides en condiciones capacitantes y determinando los siguientes patrones: (i) bajo nivel de capacitación (patrón 1): espermatozoides sin fluorescencia o solo en el acrosoma, pieza media y/o flagelo; (ii) nivel medio de capacitación (patrón 2): fluorescencia en el segmento subecuatorial sin marcaje en el área del acrosoma y con o sin presencia de fluorescencia en la pieza media y flagelo; y (iii) alto nivel de capacitación (patrón 3): espermatozoides con fluorescencia en el segmento subecuatorial y el acrosoma, con o sin marcaje en la pieza media y flagelo.

8.6.2. Inmunodetección en membrana (*Western Blot*)

Después de la incubación en condiciones capacitantes, los espermatozoides se centrifugaron (Eppendorf Centrifuga 5810R) en 1 mL de PBS a 700 g. Después, las muestras se resuspendieron en tampón de Laemmli, se calentaron 5 min a 100°C y se centrifugaron una vez más a 700 g. Los sobrenadantes resultantes se suplementaron con β -mercaptoetanol al 5% y se calentaron nuevamente durante 3 min a 100°C. Se cargaron extractos de proteínas equivalentes a 2×10^6 espermatozoides por carril, a continuación, se realizó la electroforesis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) y electro transferencia a membranas PVDF (Bio-Rad Laboratorios Madrid, España) a 250 mA durante 90 min en hielo (Navarrete *et al.*, 2015).

Los anticuerpos utilizados fueron: anticuerpo primario anti-Tyr-P (4G10, Millipore, CA, EE. UU) y anticuerpo secundario (cabra / anti-ratón-FITC Bio-Rad Laboratories, Madrid, España), ambos diluidos 1:10.000 en 1% de BSA y, como control de carga, el anticuerpo anti- β -tubulina a 1: 5.000 en BSA al 1%. Con este fin, las membranas de PVDF se separaron a 60°C durante 20 min en SDS al 2%, β -mercaptoetanol al 0.74% y Tris 62.5 mM, pH 6.5, y luego se lavaron cinco veces durante 5 min cada una en T-TBS. Las transferencias se

visualizaron por quimioluminiscencia (Amersham Imager 600, GE Healthcare) usando el sustrato de transferencia Western Pierce® ECL 2 (80196, Lumigen Inc, Southfield, MI, EE. UU).

La cantidad relativa de señal en cada membrana se cuantificó utilizando el programa ImageQuant TL v8.1 (GE Healthcare, Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido) (Navarrete *et al.*, 2015; Soriano-Úbeda *et al.*, 2017; Soriano-Ubeda *et al.*, 2019).

8.7. Análisis de la movilidad espermática

Los parámetros de movilidad analizados fueron: movilidad total y progresiva (%), velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidad media (VAP, $\mu\text{m/s}$), índice de linealidad (LIN, %), índice de rectitud (STR, %), índice de oscilación (WOB, %), amplitud promedio del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μm) y frecuencia de batido (BCF, Hz). Para determinar que un espermatozoide era móvil y progresivo, se consideraron los siguientes criterios: VAP $>10 \mu\text{m/s}$ y STR $>45\%$, respectivamente. Las determinaciones de la movilidad se realizaron a 25 fotogramas por segundo durante un segundo (25 imágenes) (Lacalle *et al.*, 2021; Michos *et al.*, 2021).

Se colocó una muestra de 4 μL en una cámara precalentada a 38.5°C (SpermTrack20®, PROiSER R + DSL, Valencia, España) y se observó bajo un microscopio de contraste de fases a 10 aumentos (Leica® DMR, Wetzlar, Alemania) con una cámara digital (Basler Vision, Ahrensburg, Alemania). Los parámetros de movilidad se determinaron mediante el programa System ISAS® (PROiSER R + DSL, Valencia, España).

8.8. Viabilidad e integridad acrosomal del espermatozoide

Las muestras se centrifugaron con PBS durante 10 min a 270 g a temperatura ambiente con la concentración ajustada a 1×10^6 espermatozoides / mL. Posteriormente, se colocaron 10 μL de la muestra en un portaobjetos. A continuación, las muestras se dejaron

secar al aire, se permeabilizaron y fijaron con metanol al 100% durante 10 min a temperatura ambiente. Seguidamente, las muestras se lavaron en PBS, y los espermatozoides se incubaron con 200 mg / mL de lectina de *Arachis hypogaea* (PNA-FITC) durante 10 min a 37 ° C en oscuridad. Finalmente, se lavaron tres veces durante 5 min en PBS. Las muestras se evaluaron bajo microscopía de fluorescencia (Leica® DM4000 Led, Wetzlar, Alemania, 495/520 nm) contando al menos 200 células por grupo. Los espermatozoides se clasificaron de la siguiente manera: (i) acrosoma intacto: espermatozoide con fluorescencia verde; y (ii) acrosoma dañado: espermatozoide sin fluorescencia.

Para evaluar la viabilidad, la concentración de los espermatozoides se ajustó a 10×10^6 espermatozoides / mL y las muestras se incubaron con 20 μ L de yoduro de propidio 0.5 mg / mL durante 10 min a 37°C en oscuridad. Los espermatozoides se clasificaron en: (i) espermatozoides muertos: cabeza teñida de rojo; o (ii) espermatozoides vivos: sin fluorescencia. Las muestras se evaluaron bajo microscopía de fluorescencia (Leica® DM4000 Led, Wetzlar, Alemania, 495/520 nm) contando al menos 200 células por grupo.

8.9. Cuantificación de Grupos SH

El contenido de los grupos SH de las proteínas en los espermatozoides capacitados a 0 y 4 h, fueron evaluados con el marcador 5-iodo acetamido fluoresceína (5-IAF), se utilizaron alícuotas de $5-10 \times 10^6$ espermatozoides/mL, las cuales se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos en 5 μ L de 5-IAF de una solución *stock* de 500 μ M y se analizaron mediante citometría de flujo, con un filtro de 525nm para 5-IAF, evaluando 20,000 espermatozoides por muestra con el siguiente criterio: baja fluorescencia o nula de 5-IAF (baja concentración de grupo SH), alta fluorescencia (alta concentración de grupo SH) (Gadea *et al.*, 2005).

8.10. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ERO)

El contenido de ERO en espermatozoides se determinó mediante citometría de flujo usando ensayos con diacetato de diclorohidrofluoresceína (H₂DCFDA) (Cathcart *et al.*, 1983), el cual no es fluorescente y es permeable en la célula, al ingresar el medio intracelular los grupos acetato son hidrolizados por las esterasas formando 2',7'-diclorofluorescina, este último será oxidado por las ERO resultando en un compuesto altamente fluorescente.

Se utilizaron alícuotas de 1×10^6 espermatozoides en 1mL de medio capacitante TALP (sin suplementar) en tubos protegidos de la luz, a los que se les agregó (a excepción del control): 50 μ L de H₂DCFDA a 32 μ M.

Los espermatozoides se incubaron durante 15 min con H₂DCFDA en total oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 1500 g x 5 min (Bass *et al.*, 1983) con la finalidad de descartar el H₂DCFDA que no se incorporó a las células. El botón se resuspendió en 1mL de medio TALP (sin suplementar), antes de cuantificar la intensidad de fluorescencia en el citómetro de flujo, usando una longitud de onda de excitación de 480nm y una longitud de onda de emisión de 520nm.

Durante la preparación de las muestras, dos alícuotas de espermatozoides se usaron como control negativo (sin H₂DCFDA), a otras dos se les agregó H₂DCFDA y a otras dos 100 μ L de H₂O₂ (control positivo). Todo esto en el momento previo a cuantificar la intensidad de fluorescencia.

Para el análisis en el citómetro de flujo, se tomaron alícuotas de 1×10^6 de espermatozoides y se evaluaron 20,000 células por muestra a las cero horas (0 h) y a las cuatro horas (4 h) de incubación en medio capacitante TALP (suplementado) con diferentes concentraciones de GSH (0, 0.5, 1 y 5mM) (Arenas-Ríos, 2009).

8.11. Maduración *in vitro* de ovocitos (MIV)

Una vez lavados los ovarios, se pincharon folículos de 3-6 mm de diámetro utilizando jeringas de 10 mL con aguja estéril de 1.2 x 40 mm (G18). El líquido folicular porcino (PFF) se recogió en tubos de 15 mL y se colocó en una placa térmica (38.5°C) y se dejó incubar de 5 a 10 min para obtener un sedimento. El sedimento se lavó en PBS a 38.5°C y se depositó en una placa Nunc®. Para obtener los ovocitos, se utilizó un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ-10A, Japón) y una pipeta Pasteur de vidrio prefabricada para aspirar el complejo ovocito-células del cúmulo (COC). Se seleccionaron ovocitos con citoplasma homogéneo y al menos tres capas de células del cúmulo. Los COCs (50-55 por pozo) se incubaron en 500 µL de medio NCSU-37a (Universidad Estatal de Carolina del Norte-37: NaCl 108.73 mM, NaHCO₃ 25.07 mM, KCl 4.78 mM, KH₂PO₄ 1.19 mM, MgSO₄ 1.19 mM • 7H₂O, 1.70 CaCl₂mM•2H₂O, glucosa 5.55 mM, glutamina 1 mM, D-sorbitol 12 mM, penicilina G 0.1 UI, estreptomicina 0.034 mM, suplementado con cisteína 0.57 mM, 1 mM de dibutilil cAMP, insulina 5 µg/ml, 50 µM β-mercaptoetanol, 10 UI/mL de gonadotropina coriónica equina (eCG; Foligon; Intervet International), 10 UI/mL de hCG (Veterin Corion, Divasa Farmavic) y 10% PFF (v / v)) previamente equilibradas durante 3 h a 38.5°C / 5% de CO₂ durante 20-22 h en una placa Nunc® de 4 pocillos. Posteriormente, los COCs se transfirieron a 500 µL de medio NCSU-37b libre de eCG, hCG y dibutilil AMPc, donde se incubaron otras 20-22 h en las mismas condiciones (Petters y Wells, 1993).

8.12. Fecundación *in vitro* (FIV)

Después de la MIV (40-44 h), las células del cúmulo se eliminaron mediante extracción mecánica y los ovocitos se transfirieron a otra placa de 4 pozos. Antes de la co-incubación de gametos, los espermatozoides se sometieron a la selección de Percoll®, como se describió anteriormente. Los ovocitos se co-incubaron en TALP con 1 x 10⁴ espermatozoides seleccionados por mL en condiciones de 0-GSH, 0.5-GSH, 1-GSH y 5-

GSH durante 4 h a 38.5°C / 5% CO₂. Posteriormente, se transfirieron a 500 µL de TALP, libre de GSH, durante las 14 h restantes de incubación (Petters y Wells, 1993; Rath *et al.*, 1999). Después de la incubación, los cigotos se tiñeron para su evaluación. Brevemente, los cigotos se lavaron en PBS suplementado con 1 g / L de alcohol polivinílico (PBS / PVA) y se fijaron en glutaraldehído (0.5% en PBS) durante 30 min (Ye *et al.*, 2002). A continuación, se lavaron durante 5 min en PBS / PVA y se tiñeron con Hoechst al 1% (bisbenzimidazol H trihidrocloruro 33342) (Ye *et al.*, 2002) en PBS durante 15 min en oscuridad. Finalmente, se montaron en portaobjetos y se evaluaron bajo microscopía de fluorescencia (Leica® DM4000 Led, Wetzlar, Alemania, 460/490 nm) (Figura 10a) (Lopez-Ubeda *et al.*, 2017).

Los parámetros evaluados fueron: tasa de penetración (porcentaje de ovocitos penetrados por al menos un espermatozoide), tasa de monospermia (porcentaje de ovocitos penetrados por un solo espermatozoide del total penetrado) y tasa de eficiencia de FIV (porcentaje de ovocitos que fueron penetrados y monospermicos del número total inseminado) (Figura 10b).

8.13. Cultivo embrionario *in vitro*

Dieciocho horas posteriores a la inseminación, los cigotos se transfirieron (~ 30 embriones por grupo) al medio NCSU23a (108.73 mM de NaCl, 25.07 mM de NaHCO₃, 4.78 mM de KCl, 1.19 mM de KH₂PO₄, 1.19 mM de MgSO₄·7H₂O, 1.70 mM de CaCl₂·2H₂O, 0.5 mM de piruvato de sodio, 5 mM de lactato de sodio, 1 mM de L-glutamina, 7 mM de taurina, penicilina G 0.1 UI, 0.034 mM de estreptomycin, 0.087 mM de insulina y 50 mM de β-mercaptoetanol), suplementado con 5 mM hipotaurina, 0.4% BSA-FAF, 1% MEM (aminoácidos no esenciales) y 2% BME (aminoácidos esenciales), y se incuban a 38.5°C / 5% CO₂ y 7% oxígeno durante 22-24 h (Petters y Wells, 1993; Romar *et al.*, 2019).

Posteriormente, se evaluó el porcentaje de división celular (*cleavage*) y solo aquellos embriones que presentaron 2-4 células fueron transferidos al medio NCSU23b (108.73 mM de NaCl, 25.07 mM de NaHCO₃, 4.78 mM de KCl, 1.19 mM de KH₂PO₄, 1.19 mM de MgSO₄•7H₂O, 1.70 mM de CaCl₂•2H₂O, 5.55 mM de D-glucosa, 1 mM de L-glutamina, 7 mM de taurina, penicilina G 0.1 UI, 0.034 mM de estreptomicina, 0.087 mM de insulina y 50 µM de β-mercaptoetanol), suplementado con hipotaurina (5 mM), BSA-FAF (0.4%), MEM 1% y BME 2%, durante otras 120 h en las mismas condiciones para completar 7 días de desarrollo post-inseminación (Petters y Wells, 1993).

Finalmente, los blastocistos obtenidos se fotografiaron con una cámara digital (Nikon® D40, Japón) acoplada a un microscopio invertido (Nikon® Diaphot 300, Japón). El diámetro de los blastocistos fotografiados se evaluó con el programa ImageJ® (programa abierto v. 1.48d) (Rueden *et al.*, 2017). Posteriormente, los blastocistos se tiñeron con Hoechst (como se explicó anteriormente para los ovocitos) para evaluar el número total de células por blastocito bajo microscopía de fluorescencia (Leica® DM4000 Led, Wetzlar, Alemania, 460/490 nm).

8.14. Análisis estadístico

Los datos se expresaron como medias ± error estándar de la media (SEM). Los datos de CTC (n=17), Tyr-P (n=10), viabilidad (n=6) e integridad acrosomal (n=4) se analizaron utilizando el procedimiento general para medidas lineales repetidas. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con $p < 0.05$. Cuando los resultados fueron significativos, los valores se compararon mediante la prueba post-hoc de comparación múltiple de Tukey-HSD. Los datos de FIV [penetración, monospermia y eficiencia (n=5)] y cultivo de embriones *in vitro* [tasas de división y blastocistos (n=5) (representadas como porcentajes) se compararon mediante una prueba de Chi-cuadrado, considerando la corrección de Bonferroni. Los datos de motilidad (n=9) se analizaron mediante ANOVA de

una vía. Cuando ese ANOVA reveló un efecto significativo, los valores se compararon mediante una prueba post-hoc de comparación múltiple de Tukey-HSD. El diámetro de los blastocistos y el número de células por blastocisto se analizaron mediante una prueba de Kruskal-Wallis. Cuando se observaron diferencias, los grupos se compararon con una prueba post-hoc de rango de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico RStudio® versión 1.2.5001.

9. Resultados

9.1. Capacitación espermática

9.1.1. Compartimentación de calcio por CTC

Los cambios en la compartimentación del calcio (relacionados con el estado del espermatozoide capacitado) entre los grupos experimentales se observaron solo después de 4 h de incubación (Figura 6b). El valor más alto se encontró en el grupo 1-GSH ($47.71 \pm 5.62\%$), significativamente diferente del resto de los grupos experimentales (C: $37.53 \pm 5.79\%$; 0.5-GSH: $28.65 \pm 5.88\%$ y 5-GSH: $21.71 \pm 6.64\%$, $p < 0.05$). La compartimentación del calcio de los espermatozoides fue significativamente menor en el grupo de 5-GSH en comparación con el control ($p < 0.05$).

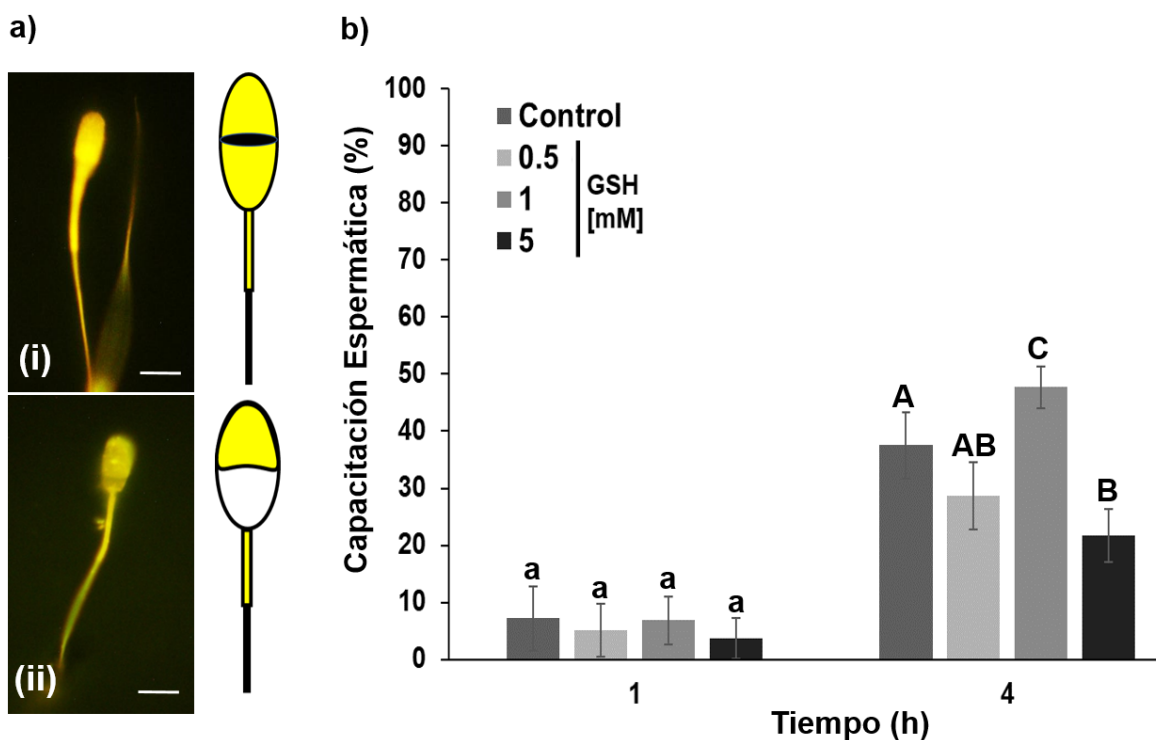


Figura 6. Capacitación espermática evaluada mediante la técnica de compartimentación del calcio (CTC). Los espermatozoides se incubaron en condiciones capacitantes durante 1 y 4 h en presencia de diferentes concentraciones de GSH (control 0, 0,5, 1 y 5 mM). a) Imágenes representativas de la compartimentación del calcio en los espermatozoides: (i) espermatozoides no capacitados: fluorescencia sobre toda la cabeza del espermatozoide y parte media del flagelo; (ii) espermatozoides capacitados: fluorescencia en el segmento ecuatorial y parte media del flagelo, pero sin fluorescencia en la región post-acrosomal de la cabeza. Barra de escala a 10 μm . b) Efecto de concentraciones crecientes de GSH sobre la capacitación espermática a 1 y 4 h. Letras diferentes (a, A, B, C (minúsculas 1h y mayúsculas 4h)) indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo tiempo ($p < 0.05$) ($n = 17$). Los datos se expresan como media \pm SEM.

9.1.2. Inmunolocalización de la Tyr-P

Los patrones de la Tyr-P en los espermatozoides capacitados se presentan en la Figura 7. Después de 1 h de incubación (Figura 7b), se encontró un nivel más alto del patrón 2 (nivel medio de capacitación espermática) en todos los grupos de GSH (0.5 -GSH: $63.17 \pm 1.55\%$; 1-GSH: $55.00 \pm 1.60\%$ y 5-GSH: $39.00 \pm 1.55\%$) en comparación con el control ($32.50 \pm 1.57\%$) ($p < 0.05$), teniendo en el grupo 0.5-GSH los valores más altos. Sin embargo, el patrón 3 (alto nivel de capacitación espermática) fue significativamente mayor en los grupos 1-GSH ($27.83 \pm 1.60\%$) y 5-GSH ($28.17 \pm 1.55\%$), en comparación con el control ($19.67 \pm 1.58\%$) y 0.5-GSH ($18.50 \pm 1.60\%$) ($p < 0.05$) (Figura 7b).

Después de 4 h de incubación, el patrón 1 de Tyr-P fue significativamente menor en los grupos de 0.5-GSH ($17.10 \pm 5.15\%$) y 1-GSH ($13.34 \pm 5.06\%$) que en el control ($38.00 \pm 5.10\%$) ($p < 0.05$), mientras que los resultados para el grupo de 5-GSH ($21.60 \pm 5.20\%$) fueron estadísticamente similares en todos los grupos. Los patrones 2 y 3 se expresaron de manera similar entre los grupos experimentales.

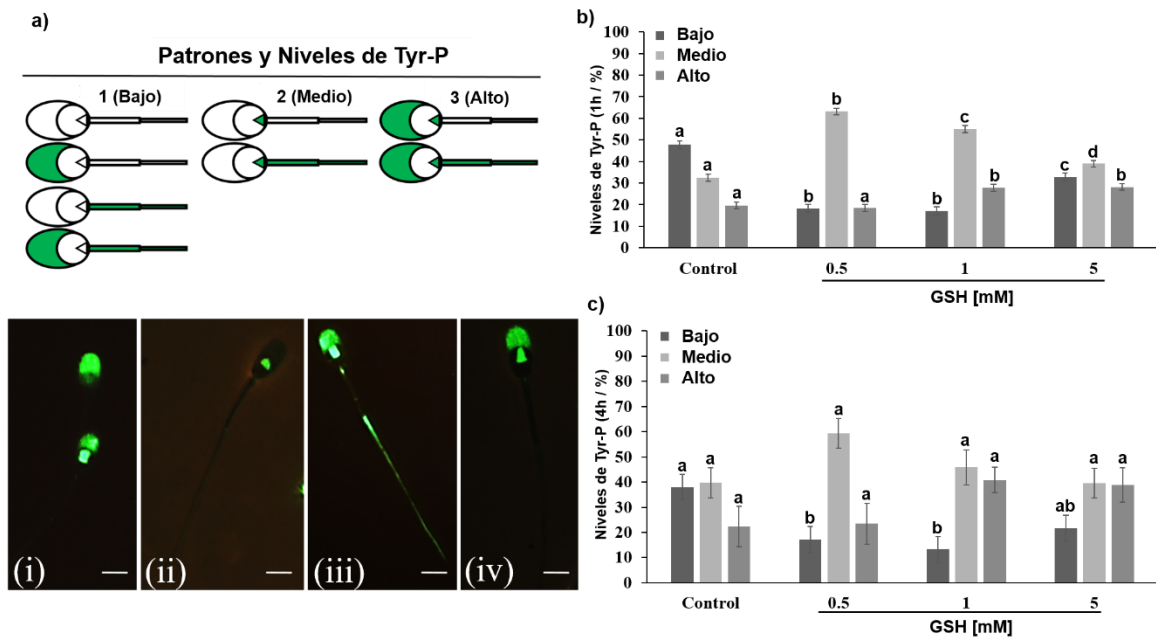


Figura 7. Inmunolocalización de Tyr-P en espermatozoides capacitados después de incubarlos en condiciones capacitantes con diferentes concentraciones de GSH. a) Patrones de Tyr-P en los espermatozoides: Patrón 1 (nivel bajo de Tyr-P), espermatozoides sin fluorescencia o solo en el acrosoma o solo en el flagelo, o ambos (acrosoma y flagelo); Patrón 2 (nivel medio de Tyr-P), fluorescencia en el segmento sub-ecuatorial sin tinción en el área del acrosoma y con o sin presencia de fluorescencia en el flagelo; Patrón 3 (alto nivel de Tyr-P), espermatozoides con fluorescencia en el segmento sub-ecuatorial y acrosoma, con o sin fluorescencia en el flagelo. (i-iv) Imágenes de espermatozoides con diferentes patrones Tyr-P: (i) Patrones 1 y 3; (ii) Patrón 2; (iii-iv) Patrón 3. Barra de escala a 10 μm . b) y c) Niveles de Tyr-P en espermatozoides de cerdo a 1 y 4 h de incubación en medio TALP, respectivamente. Letras diferentes (a, b, c, d) indican diferencias estadísticas entre grupos experimentales en el mismo tipo de patrón ($p < 0.05$) ($n = 6$). Datos expresados como media \pm SEM.

9.1.3. Tyr-P en el espermatozoide mediante inmunodetección en membrana (Western blot)

La Tyr-P en p32 y p18 fueron evaluados por WB (Figura 8). La señal de Tyr-P fue similar entre los grupos experimentales y el control, después de 1 o 4 h de incubación en las bandas p32 o p18.

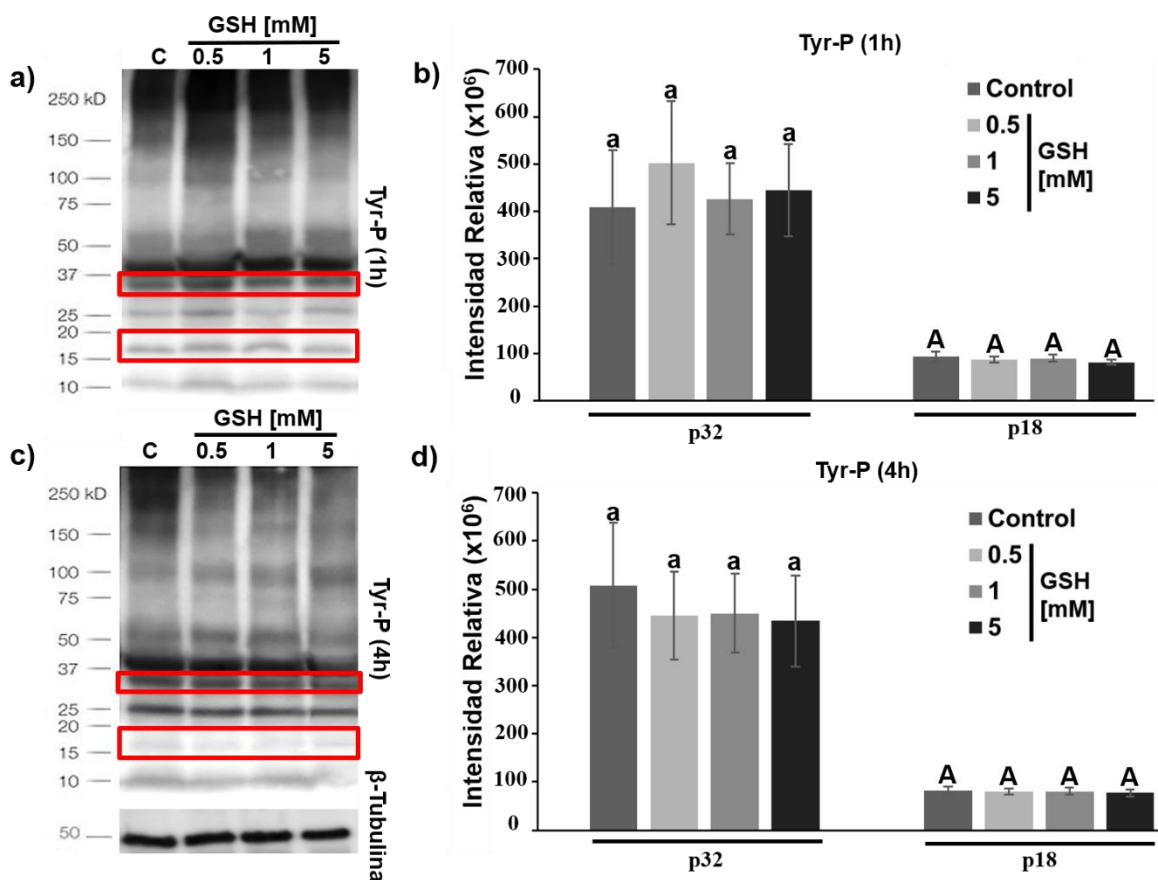


Figura 8. Efecto del GSH durante la capacitación espermática y su efecto sobre la Tyr-P analizada por inmunodetección en membrana; a) y c) Western blot representativos de Tyr-P en espermatozoides capacitados a 1 y 4 h, respectivamente, utilizando diferentes concentraciones de GSH. Se usó β -tubulina como control de carga. Los recuadros rojos indican Tyr-P analizado en las bandas p32 y p18. Los gráficos b) y d) indican el número relativo de señal sobre la Tyr-P en p32 y p18, cuantificadas por el programa ImageQuant TL

v. 8.1 (GE Healthcare, Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido) (n = 4). Letras (a) minúsculas p32 y (A) mayúsculas p18. Datos expresados como media \pm SEM.

9.2. Movilidad espermática

Los resultados de la movilidad en los espermatozoides se muestran en la Tabla 1. No hubo diferencias entre los grupos experimentales en ninguno de los parámetros evaluados después de 1 h de incubación (Tabla 1a). Sin embargo, después de 4 h (Tabla 1b), se encontraron diferencias tanto para la movilidad total como progresiva. En ambos casos, los valores más altos correspondieron al grupo de 5-GSH y los más bajos al grupo de control ($p < 0.05$). Mientras tanto, para los grupos de 0.5 y 1-GSH, la movilidad total y progresiva fue estadísticamente similar.

Tabla 1. Evaluación de la movilidad de los espermatozoides por el sistema CASA a 1 (a) y 4 h (b) de incubación en condiciones capacitantes con diferentes concentraciones de GSH.

a)

[mM] GSH	Movilidad Total (%)	Movilidad Progresiva (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)
Control	54.22 \pm 5.47 ^a	42.00 \pm 4.99 ^a	74.78 \pm 4.21 ^a	41.33 \pm 2.81 ^a	51.33 \pm 2.10 ^a
0.5	59.56 \pm 5.67 ^a	46.78 \pm 5.38 ^a	71.33 \pm 4.95 ^a	38.00 \pm 4.31 ^a	46.22 \pm 3.34 ^a
1	58.33 \pm 5.51 ^a	42.33 \pm 5.32 ^a	82.00 \pm 4.59 ^a	47.00 \pm 2.47 ^a	54.89 \pm 3.07 ^a
5	49.44 \pm 6.27 ^a	33.78 \pm 4.76 ^a	89.67 \pm 6.07 ^a	47.33 \pm 3.79 ^a	58.00 \pm 3.40 ^a
[mM] GSH	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
Control	61.78 \pm 4.12 ^a	83.22 \pm 2.55 ^a	67.89 \pm 3.86 ^a	1.33 \pm 0.17 ^a	12.67 \pm 1.17 ^a
0.5	51.56 \pm 4.28 ^a	77.89 \pm 3.00 ^a	66.67 \pm 3.57 ^a	1.67 \pm 0.17 ^a	10.44 \pm 0.88 ^a
1	53.11 \pm 3.72 ^a	81.89 \pm 2.14 ^a	65.78 \pm 3.21 ^a	1.56 \pm 0.18 ^a	12.11 \pm 1.10 ^a
5	50.89 \pm 4.74 ^a	81.11 \pm 2.61 ^a	64.78 \pm 3.41 ^a	1.78 \pm 0.15 ^a	12.89 \pm 1.37 ^a

b)

[mM] GSH	Movilidad Total (%)	Movilidad Progresiva (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)
Control	20.78 \pm 3.85 ^a	10.33 \pm 1.58 ^a	65.11 \pm 5.47 ^a	23.44 \pm 2.14 ^a	36.00 \pm 2.25 ^a

0.5	22.56 ± 1.49 ^{ab}	13.56 ± 0.99 ^{ab}	75.44 ± 7.70 ^a	31.89 ± 2.34 ^a	40.89 ± 1.06 ^a
1	25.78 ± 1.61 ^{ab}	15.11 ± 1.79 ^{ab}	90.22 ± 10.69 ^a	32.11 ± 3.96 ^a	48.11 ± 3.41 ^a
5	35.00 ± 2.48 ^b	19.00 ± 2.14 ^b	70.44 ± 5.44 ^a	24.00 ± 2.46 ^a	43.22 ± 5.92 ^a
[mM] GSH	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
Control	36.89 ± 4.86 ^a	64.33 ± 4.51 ^a	54.11 ± 4.10 ^a	1.56 ± 0.69 ^a	9.78 ± 1.12 ^a
0.5	45.44 ± 7.33 ^a	70.67 ± 6.67 ^a	64.78 ± 4.72 ^a	1.22 ± 0.15 ^a	9.67 ± 0.55 ^a
1	41.33 ± 8.76 ^a	66.78 ± 7.23 ^a	55.56 ± 6.78 ^a	1.78 ± 0.28 ^a	11.00 ± 0.80 ^a
5	36.56 ± 7.02 ^a	64.44 ± 5.76 ^a	54.67 ± 5.57 ^a	1.33 ± 0.17 ^a	9.00 ± 0.73 ^a

Movilidad total y progresiva (%), velocidad curvilínea (VCL, µm / s), velocidad rectilínea (VSL, µm / s), velocidad media (VAP, µm / s), linealidad (LIN,%), rectitud (STR, %) y los índices de oscilación (WOB,%), la amplitud promedio del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, µm) y la frecuencia de latido (BCF, Hz) fueron todos analizados. Letras diferentes (a, b) en la misma columna indican diferencias estadísticas (p <0.05) (n = 9). Datos expresados como media ± SEM.

9.3. Integridad acrosomal y viabilidad espermática

La integridad acrosomal y la viabilidad del espermatozoide no se vieron afectadas por la presencia de GSH, independientemente de su concentración, ya que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales y el grupo de control después de 1 o 4 h de incubación (Figura 9a, b).

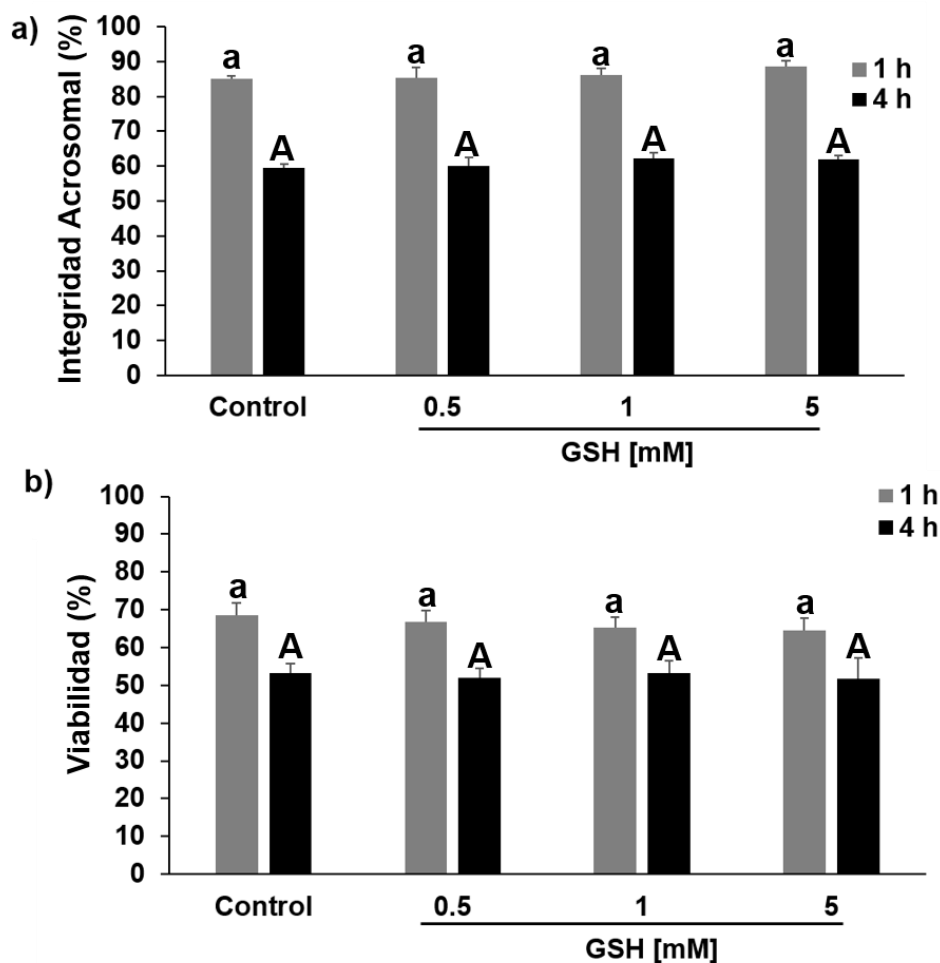


Figura 9. Evaluación de la integridad acrosomal (a) y viabilidad (b) de los espermatozoides después de la incubación en condiciones capacitantes (1 y 4 h) con diferentes concentraciones de GSH. La integridad acrosomal del espermatozoide (n = 4) y la viabilidad (n = 6) se evaluaron mediante PNA-FITC y yoduro de propidio respectivamente, bajo

microscopía de fluorescencia. Letras (a) minúsculas 1h y (A) mayúsculas 4h. Datos expresados como media \pm SEM.

9.4. Grupos SH

Tras 4 h de capacitación, se aprecia un incremento en la concentración grupos SH en los grupos experimentales 0.5 y 1-GSH ($p < 0.05$) respecto al control. El grupo 5-GSH no mostró diferencias significativas (Datos no mostrados).

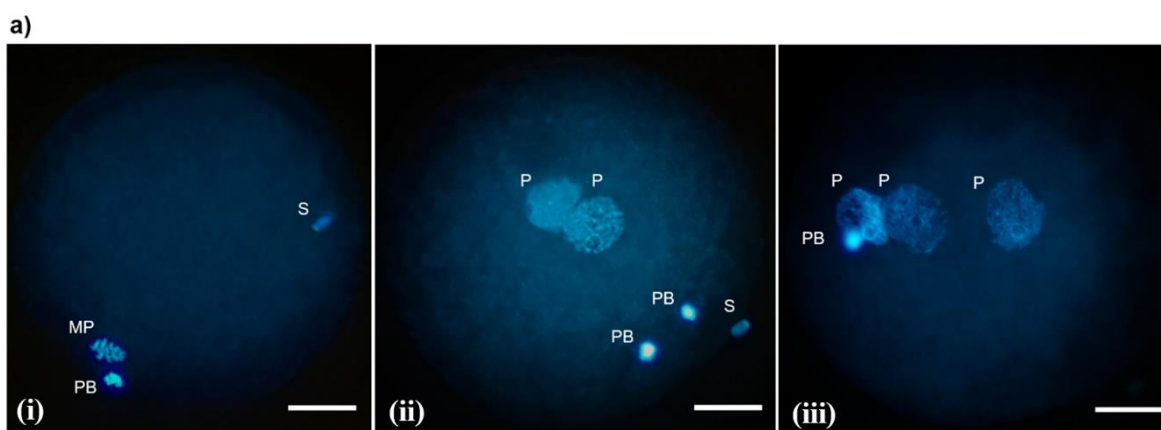
9.5. ERO

En ERO, a las 0 h no se encontraron diferencias en ninguno de los casos, sin embargo, a las 4 h de capacitación, se encontró un incremento significativo ($p < 0.05$) en 5-GSH respecto al control como con los otros tratamientos (Datos no mostrados).

9.6. Fecundación *in vitro* (FIV) y cultivo embrionario

El efecto de GSH sobre la FIV se muestra en la Figura 10b, donde observamos que: La penetración, monospermia y eficiencia en el grupo control fueron 32.1, 48 y 15.45%, respectivamente, mostrando diferencia en estos mismos parámetros, el grupo de 1-GSH, donde se encontró un incremento significativo de: 47.2, 66.3 y 31.25% respectivamente ($p < 0.05$).

La tasa de división de los cigotos no difirió significativamente entre los grupos experimentales (Figura 11b). Solo se observó un aumento significativo en la tasa de blastocistos (%) (Figura 11b) en el grupo de 0.5-GSH (45.2%) con respecto al grupo de 5-GSH (34.1%) ($p < 0.05$), pero no con los otros grupos experimentales. Con respecto al diámetro de los blastocistos (μm), la única diferencia observada fue entre los grupos de 0.5-GSH (380.00) y 5-GSH (357.50) ($p < 0.05$) (Figura 11c). El número total de células por blastocisto fue similar entre todos los grupos experimentales (rango: 49.00-58.50 células por blastocisto) (Figura 11d).



b)

Evaluación de la FIV				
[mM GSH]	Número de Ovocitos Evaluados	Penetración (%)	Monospermia (%)	Eficiencia (%)
Control	233	75 / 233 (32.1) ^a	36 / 75 (48.0) ^a	15.45 ^a
0.5	183	61 / 183 (33.3) ^a	30 / 61 (49.2) ^a	16.39 ^a
1	176	83 / 176 (47.2) ^b	55 / 83 (66.3) ^b	31.25 ^b
5	220	56 / 220 (25.5) ^a	27 / 56 (48.2) ^a	12.27 ^a

Figura 10. Efecto del GSH durante la interacción de gametos. a) Imágenes representativas para la evaluación de la FIV: (i) ovocito no penetrado (metafase II); (ii) ovocito penetrado (monospermico); (iii) ovocito penetrado (polispermico). S = espermatozoide, MP = placa metafásica, PB = cuerpo polar, P = pronúcleo. Barra de escala a 70 μm . b) Resultados que muestran el efecto de las diferentes concentraciones de GSH sobre la FIV. Letras diferentes en la misma columna (a, b) indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre grupos experimentales ($n = 5$). Los parámetros evaluados fueron: tasa de penetración (porcentaje de ovocitos penetrados por al menos un espermatozoide), tasa de monospermia (porcentaje de ovocitos penetrados por un solo espermatozoide del total penetrado) y tasa de eficiencia de la FIV (porcentaje de ovocitos que fueron penetrados y monospermicos del número total inseminado).

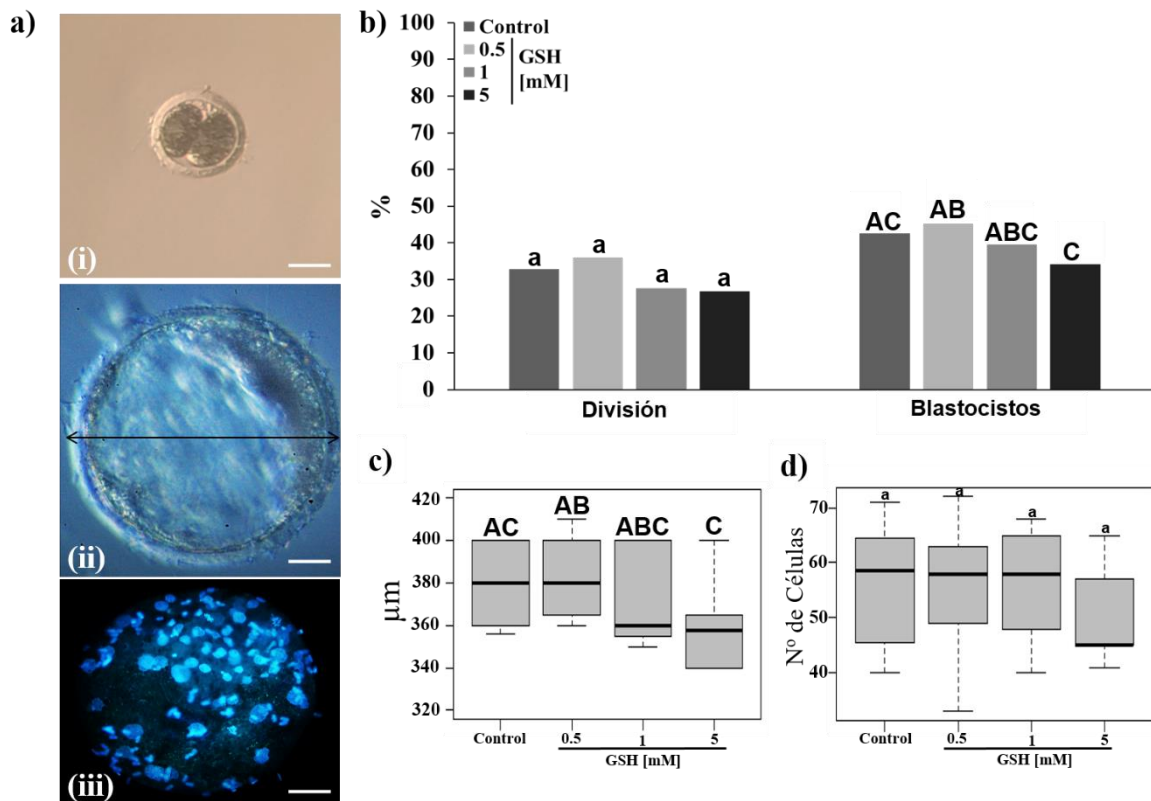


Figura 11. Efecto del GSH durante el cultivo de embriones *in vitro*. a) (i) Embrión en la etapa de 2 células, evaluado a las 42-44 h después de la inseminación (microscopio campo claro); (ii) Diámetro del blastocisto cuantificado mediante el programa Image J; (iii) blastocisto expandido y teñido con Hoechst 33342 (microscopio de fluorescencia). Barra de escala a 70 μm . b) Porcentaje de división y blastocistos totales. c) Diámetro de los

blastocistos (μm); y d) número total de células por blastocisto. Número de cigotos evaluados por tratamientos: control (164); 0.5-GSH (172); 1-GSH (156); 5-GSH (165). El porcentaje de blastocistos se calculó a partir de embriones divididos. Letras (a) minúsculas no muestran diferencias y (A, B, C) mayúsculas, indica diferencias estadísticamente significativas entre grupos experimentales ($p < 0.05$) ($n = 5$).

10. Discusión

La industria porcina actualmente enfrenta varios retos, como son: cuestiones de espacio en sus instalaciones, dieta adecuada dependiendo el fin zootécnico y problemas reproductivos, resumiendo lo anterior, en la necesidad de un fortalecimiento en el bienestar animal (Pedersen, 2018) ya que este último, se ha relacionado con una mejora en la reproducción.

Por lo tanto, se han dado a la tarea, principalmente los productores, de buscar opciones que mejoren la productividad. Un ejemplo de lo anterior es la adición de antioxidantes en medios de conservación / preservación de gametos, específicamente, en el espermatozoide de cerdo (Estrada *et al.*, 2014). No obstante, se ha observado que la adición de concentraciones altas de GSH puede inhibir procesos importantes como la capacitación espermática (Gadea *et al.*, 2005).

Con base en lo anterior, en el presente estudio se determinó la participación del antioxidante GSH, sobre la capacitación espermática, FIV y desarrollo embrionario.

El proceso de capacitación ha sido descrito como la modificación fisiológica y bioquímica de los espermatozoides durante su tránsito por el aparato reproductor femenino, esto es fundamental para adquirir capacidad fertilizante (Darszon *et al.*, 2011; Navarrete *et al.*, 2015; Visconti *et al.*, 2011).

La capacitación espermática se puede realizar *in vitro*, pero, para que los cambios se desarrollen correctamente el sistema redox es fundamental, ya que puede generar estrés oxidante durante el proceso de preparación y capacitación (Ford, 2004). Durante la capacitación espermática, se produce de manera fisiológica H_2O_2 (Lewis y Aitken, 2001; Scarlata y O'Flaherty, 2020), lo cual aumenta la Tyr-P (revisado en: (Scarlata y O'Flaherty, 2020)). Cuando la producción de ROS supera las defensas antioxidantes del espermatozoide, se ha observado que aparecen efectos perjudiciales (Agarwal *et al.*, 2014).

El presente estudio muestra que, el uso de GSH como agente antioxidante, modula la compartimentación del calcio, Tyr-P, movilidad de los espermatozoides, fecundación *in vitro* (penetración, monospermia y eficiencia) así como el desarrollo embrionario (porcentaje de blastocistos y su diámetro).

Se observó que esta modulación difería según el tiempo y la concentración de GSH utilizados. Además, también se observó que la FIV y el desarrollo posterior del embrión, estaban modulados por la concentración de GSH cuando se añadían durante la interacción de gametos. Los efectos de GSH en parámetros de los espermatozoides como, la compartimentación del calcio, la ubicación de Tyr-P y la movilidad, en nuestro estudio, confirman el papel modulador de GSH en la capacitación de los espermatozoides.

Se sabe que el calcio juega un papel importante en la funcionalidad de los espermatozoides (Navarrete *et al.*, 2015; Freitas *et al.*, 2017). En este sentido, nuestros resultados muestran que la compartimentación del calcio está modulada por GSH, y que la adición de 1 mM aumenta el nivel de espermatozoides capacitados después de 4 h de incubación en medio capacitante. Por el contrario, el tratamiento de espermatozoides con 5 mM de GSH durante 4 h en las mismas condiciones, ejerció un efecto inhibitorio sobre la capacitación, según lo analizado por CTC, al mismo tiempo, la viabilidad y la integridad del acrosoma no mostraron diferencias con respecto al control.

De igual manera, observamos que los niveles de ERO a 5 mM de GSH después de 4 h en condiciones capacitantes impacta directamente, provocando la disminución en la capacitación espermática, debido a un desequilibrio en el sistema redox, ya que se ha reportado que es necesaria la oxidación de las proteínas, cambiando así su conformación para activar o inactivar su función (Thannickal y Fanburg, 2000).

El efecto inhibitor del GSH en altas concentraciones en el proceso de capacitación espermática, se relaciona con los reportes del papel de los antioxidantes como reguladores

en este proceso, inhibiendo la oxidación de proteínas para evitar la capacitación prematura (Spinaci *et al.*, 2018), dado que, además de la compartimentación del calcio en los espermatozoides, también la Tyr-P, es esencial para la capacitación de los espermatozoides.

La importancia de la ubicación de Tyr-P en los espermatozoides se ha asociado con el estado de capacitación en varios segmentos del oviducto (Luño *et al.*, 2013). El GSH es producido por las células epiteliales oviductales y secretado en el oviducto, específicamente en la unión útero-tubárica (Gardiner *et al.*, 1998). Es decir, la capacitación de los espermatozoides puede estar modulada por las secreciones de GSH en el oviducto. El presente estudio mostró que al agregar GSH al medio capacitante TALP afecta la ubicación de la Tyr-P en espermatozoides después de 1 y 4 h de incubación. Todos estos resultados, indican un efecto bifásico sobre la redistribución del calcio intracelular y la ubicación de Tyr-P en los espermatozoides, que depende de la concentración de GSH. Por lo tanto, podemos plantear la hipótesis de que, en condiciones de capacitación *in vitro*, una concentración baja de GSH (0.5 y 1 mM) puede equilibrar la producción de ERO y, por lo tanto, conducir a una capacitación espermática adecuada sin afectar la viabilidad o la integridad del acrosoma. Sin embargo, a una concentración más alta de GSH (5 mM), la producción de ERO puede reducirse o prevenirse, impidiendo así el proceso de capacitación. Este hallazgo podría coincidir con la mayor movilidad total y progresiva observada después de 4 h de incubación cuando se agregó 5 mM de GSH, en comparación con el grupo de control, cabe señalar, que los otros parámetros cinéticos evaluados (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH y BCF) no mostraron diferencia en ninguno de los casos. De igual manera, se han estudiado espermatozoides sometidos al proceso de congelación-descongelación, debido a que, en estas células por sus condiciones, las ERO se ven favorecidas, principalmente al momento de ser descongeladas, sin embargo, se ha reportado que, los espermatozoides permanecen

vivos, pero no son móviles (Awda *et al.*, 2009), por lo tanto, podemos sugerir basándonos en nuestros resultados de movilidad, que al agregar GSH la movilidad de puede ser mejorada ya que la célula continúa viva.

Respecto a lo anterior, también se ha reportado en espermatozoide de cerdo que, las concentraciones de GSH disminuyen con la congelación (Gadea *et al.*, 2004), lo que puede afectar el proceso de capacitación. La capacitación espermática está directamente relacionada con el equilibrio entre ERO y antioxidantes, tales cambios se han observado a nivel proteico, las ERO oxidan los residuos de cisteína de las proteínas, provocando cambios en su estructura y función, activándolos o inactivándolos, como en la dimerización de quinasas, producto del sistema redox (Ford, 2004; Thannickal y Fanburg, 2000).

Es importante señalar que la capacitación de los espermatozoides da como resultado la capacidad de los espermatozoides para realizar la RA (Stival *et al.*, 2016). El CTC evaluado por microscopía de fluorescencia, es un buen método para predecir el porcentaje de RA (Ded *et al.*, 2019). En este sentido, los resultados de la FIV obtenidos en el presente estudio coinciden entre sí, ya que muestran una eficiencia mayor cuando se utilizó 1 mM de GSH. Además, los ovocitos fueron expuestos a GSH durante la co-incubación de gametos, por lo que nuestros resultados de fecundación también se habrían visto afectados por esto. Se ha demostrado que la suplementación con GSH reduce los niveles excesivos de ERO en los ovocitos porcinos (Zhou *et al.*, 2019), y puede prevenir la peroxidación de lípidos en la membrana del ovocito al eliminar el exceso de ERO en el medio (Biggers, 1998). Se han obtenido resultados similares en otras especies, como los ratones, donde la adición de 1 mM de GSH en medios de FIV, pero no una concentración más alta, mejoró las tasas de fertilidad (Ishizuka *et al.*, 2013). También se ha reportado el efecto del GSH sobre los ovocitos (Xie *et al.*, 2018), donde observaron en ratones *knock-out* de Gsa (Sub-unidad α de proteína G), un aumento en las concentraciones de ERO, y una disminución en las

concentraciones intracelulares de GSH en ovocitos en diferentes etapas de maduración en comparación con el control, lo que demuestra el papel relevante que juega el estado redox en el ovocito.

Nuestros resultados indican que, la suplementación con GSH durante la co-incubación de gametos no tuvo ningún efecto sobre la división o el desarrollo de blastocistos, porque los embriones en etapa temprana son menos resistentes al estrés oxidante (Guerin *et al.*, 2001), la incorporación de agentes antioxidantes, no solo durante la co-incubación de gametos, sino también en los medios de cultivo, puede ser benéfico al aumentar la tasa de desarrollo de los embriones. Otros autores han demostrado que agregar GSH directamente a los medios de cultivo de embriones después de la FIV (Ozawa *et al.*, 2006) o ICSI (Li *et al.*, 2014) mejora las tasas de desarrollo de blastocistos. La única diferencia obtenida en el desarrollo del embrión en el presente estudio fue que GSH a 5 mM disminuyó las tasas de blastocistos y el diámetro de los blastocistos en comparación con la adición de 0.5 mM. Estas diferencias dependientes de la concentración de GSH se han observado en otros estudios, lo que indica que altas concentraciones de GSH en el medio podrían tener un efecto perjudicial sobre el desarrollo del embrión. Sin embargo, la explicación de este fenómeno aún no está claro, así como el por qué las concentraciones excesivas de GSH pueden ser perjudiciales para el desarrollo embrionario (Ishizuka *et al.*, 2013).

11. Conclusiones

1. La compartimentación del calcio en el espermatozoide de cerdo es favorecida cuando se agrega 1 mM de GSH, y disminuye con 5 mM de GSH.
2. La Tyr-P es afectada en las diferentes concentraciones de GSH (0.5, 1 y 5 mM), principalmente a 1 h de capacitación.
3. La movilidad total y progresiva en el espermatozoide de cerdo aumentan respecto a un control (sin GSH) en la concentración de 5 mM de GSH a las 4 h de capacitación.
4. La formación de grupos tiol y ERO se ven afectadas por las concentraciones: 0.5, 1 y 5 mM de GSH, sin embargo, los resultados no fueron concluyentes, por lo que requieren futuras investigaciones.
5. La integridad acrosomal y viabilidad, no se ven afectadas por las diferentes concentraciones de GSH.
6. La eficiencia de la FIV y el desarrollo del embrión hasta llegar a blastocisto, también son modulados por 0.5, 1 y 5 mM de GSH cuando se agregan durante la interacción de gametos.

12. Perspectivas

Con base en nuestros resultados, el paso siguiente sería la transferencia de tecnología aplicada principalmente de los pequeños productores, ya que ellos son quienes más necesitan mejorar su producción y que ésta se vea reflejada en cuestiones económicas.

Por lo anterior, proponemos las siguientes perspectivas:

- Determinar la relación entre grupos tiol / ERO y GSH a diferentes concentraciones, en la capacitación espermática.
- Transferencia embrionaria con distintas concentraciones de GSH y comparar con otros antioxidantes.
- Cuantificar concentración de GSH-GSSG

13. Referencias.

- AGARWAL, A., VIRK, G., ONG, C. y DU PLESSIS, S. S. 2014. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *The World Journal of Men's Health*, 32, 1-17.
- AITKEN, R. J. 2017. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev*, 84, 1039-1052.
- AITKEN, R. J. y BENNETTS, L. 2006. Reactive oxygen species: friend or foe. In: JONGE, C. J. D. y BARRATT, C. L. R. (eds.) *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. The Edinburgh Building, Cambridge.
- AITKEN, R. J. y DREVET, J. R. 2020. The Importance of Oxidative Stress in Determining the Functionality of Mammalian Spermatozoa: A Two-Edged Sword. *Antioxidants (Basel)*, 9.
- AITKEN, R. J. y NIXON, B. 2013. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Mol Hum Reprod*, 19, 785-93.
- AITKEN, R. J. y ROMAN, S. D. 2008. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 1, 15-24.
- ARENAS-RÍOS, E. 2009. Enzimas Anti-especies reactivas de oxígeno, como reguladores en los procesos de espermatogénesis, maduración y almacenamiento prolongado de espermatozoides en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*. Doctorado., Universidad Autónoma Metropolitana.
- ARIAS, M. E., ANDARA, K., BRIONES, E. y FELMER, R. 2017. Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): Effect on sperm quality, function and gene expression. *Reprod Biol*, 17, 126-132.
- AWDA, B. J., MACKENZIE-BELL, M. y BUHR, M. M. 2009. Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biology of Reproduction*, 81, 553-561.
- BAISHYA, S. K., BISWAS, R. K., GOVINDASAMY, K., DEKA, B. C., SINHA, S. y SINGH, M. 2018. Effect of Reduced Glutathione, Water Soluble Vitamin E Analogue and Butylated Hydroxytoluene on the Post Thaw Characteristics of Boar Spermatozoa. *Cryo Letters*, 39, 227-234.
- BARRANCO, I., TVARIJONAVICIUTE, A., PEREZ-PATINO, C., PARRILLA, I., CERON, J. J., MARTINEZ, E. A., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. y ROCA, J. 2015. High total

- antioxidant capacity of the porcine seminal plasma (SP-TAC) relates to sperm survival and fertility. *Sci Rep*, 5, 18538.
- BASS, D. A., PARCE, J. W., DECHATELET, L. R., SZEJDA, P., SEEDS, M. C. y THOMAS, M. 1983. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol*, 130, 1910-7.
- BIGGERS, J. D. 1998. Reflections on the culture of the preimplantation embryo. *Int J Dev Biol*, 42, 879-84.
- BREITBART, H. y FINKELSTEIN, M. 2018. Actin cytoskeleton and sperm function. *Biochem Biophys Res Commun*, 506, 372-377.
- CÁRDENAS-RODRÍGUEZ, N., MEDINA-CAMPOS, O. N. y PEDRAZA-CHAVERRÍ, J. 2008. Glutathión Peroxidasas: Una Familia de Enzimas. In: FAINSTEIN, M. K. (ed.) Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas.
- CATHCART, R., SCHWIERS, E. y AMES, B. N. 1983. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal Biochem*, 134, 111-6.
- CERVANTES, M. I., ARENAS-RIOS, E., LEON-GALVAN, M. A., LOPEZ-WILCHIS, R., AMBRIZ, D. y ROSADO, A. 2008. Spermatozoa epididymal maturation in the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Syst Biol Reprod Med*, 54, 196-204.
- CHANG, M. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the Fallopian tubes. *Nature*, 168, 997 - 998.
- CLAUDE GAGNON y LAMIRANDE, E. D. 2006. Controls of sperm motility. In: CHRISTOPHER J. DE JONGE y BARRATT, C. L. R. (eds.) *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge University Press ed.
- CROSS, N. L. 2004. Reorganization of lipid rafts during capacitation of human sperm. *Biol Reprod*, 71, 1367-73.
- DARSZON, A., BELTRAN, C., FELIX, R., NISHIGAKI, T. y TREVINO, C. L. 2001. Ion transport in sperm signaling. *Dev Biol*, 240, 1-14.
- DARSZON, A., NISHIGAKI, T., BELTRAN, C. y TREVINO, C. L. 2011. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol Rev*, 91, 1305-55.

- DED, L., DOSTALOVA, P., DOROSH, A., DVORAKOVA-HORTOVA, K. y PEKNICOVA, J. 2010. Effect of estrogens on boar sperm capacitation in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8, 87.
- DED, L., DOSTALOVA, P., ZATECKA, E., DOROSH, A., KOMRSKOVA, K. y PEKNICOVA, J. 2019. Fluorescent analysis of boar sperm capacitation process in vitro. *Reprod Biol Endocrinol*, 17, 109.
- DEMARCO, I. A., ESPINOSA, F., EDWARDS, J., SOSNIK, J., DE LA VEGA-BELTRAN, J. L., HOCKENSMITH, J. W., KOPF, G. S., DARSZON, A. y VISCONTI, P. E. 2003. Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem*, 278, 7001-9.
- DOMINGUEZ-REBOLLEDO, A. E., FERNANDEZ-SANTOS, M. R., GARCIA-ALVAREZ, O., MAROTO-MORALES, A., GARDE, J. J. y MARTINEZ-PASTOR, F. 2009. Washing increases the susceptibility to exogenous oxidative stress in red deer spermatozoa. *Theriogenology*, 72, 1073-84.
- DUBE, C., LECLERC, P., BABA, T., REYES-MORENO, C. y BAILEY, J. L. 2005. The proacrosin binding protein, sp32, is tyrosine phosphorylated during capacitation of pig sperm. *J Androl*, 26, 519-28.
- ESTRADA, E., RODRIGUEZ-GIL, J. E., ROCHA, L. G., BALASCH, S., BONET, S. y YESTE, M. 2014. Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione increases fertility and prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen. *Andrology*, 2, 88-99.
- FERNÁNDEZ-CHECA, G. R. C. 2008. Glutathión. In: FAINSTEIN, M. K. (ed.) *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Manual Moderno* ed.
- FORD, W. C. 2004. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update*, 10, 387-99.
- FREITAS, M. J., VIJAYARAGHAVAN, S. y FARDILHA, M. 2017. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biol Reprod*, 96, 2-12.
- FURNUS, C. C., DE MATOS, D. G., PICCO, S., GARCÍA, P. P., INDA, A. M., MATTIOLI, G. y ERRECALDE, A. L. 2008. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during in vitro maturation of cattle oocytes. *Anim Reprod Sci*, 109, 88-99.

- GADEA, J., GUMBAO, D., CÁNOVAS, S., GARCÍA-VÁZQUEZ, F. A., GRULLÓN, L. A. y GARDÓN, J. C. 2008. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 31, 40-49.
- GADEA, J., GUMBAO, D., GÓMEZ-GIMÉNEZ, B. y GARDÓN, J. C. 2013. Supplementation of the thawing medium with reduced glutathione improves function of frozen-thawed goat spermatozoa. *Reproductive Biology*, 13, 24-33.
- GADEA, J., GUMBAO, D., MATAS, C. y ROMAR, R. 2005. Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. *J Androl*, 26, 749-56.
- GADEA, J., MOLLA, M., SELLES, E., MARCO, M. A., GARCIA-VAZQUEZ, F. A. y GARDON, J. C. 2011. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology*, 62, 40-46.
- GADEA, J., SELLES, E., MARCO, M. A., COY, P., MATAS, C., ROMAR, R. y RUIZ, S. 2004. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*, 62, 690-701.
- GADELLA, TSAI P, BOERKE A y IA., B. 2008. Sperm head membrane reorganization during capacitation. *Development Biol.* 52: , 473.
- GADELLA. 2008. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim. Reprod Sci.* 107., 229.
- GARCIA-GIMENEZ, J. L., MARKOVIC, J., DASÍ, F., QUEVAL, G., SCHNAUBELT, D., FOYER, C. H. y PALLARDO, F. V. 2013. Nuclear glutathione. *Biochim Biophys Acta*, 1830, 3304-16.
- GARDINER, C. S., SALMEN, J. J., BRANDT, C. J. y STOVER, S. K. 1998. Glutathione is present in reproductive tract secretions and improves development of mouse embryos after chemically induced glutathione depletion. *Biol Reprod*, 59, 431-6.
- GERVASI, M. G. y VISCONTI, P. E. 2016. Chang's meaning of capacitation: A molecular perspective. *Mol Reprod Dev*, 83, 860-874.

- GHORBANI, M., VATANNEJAD, A., KHODADADI, I., AMIRI, I. y TAVILANI, H. 2016. Protective effects of glutathione supplementation against oxidative stress during cryopreservation of human spermatozoa. *Cryo Letters*, 37, 34-40.
- GIARETTA, E., ESTRADA, E., BUCCI, D., SPINACI, M., RODRIGUEZ-GIL, J. E. y YESTE, M. 2015. Combining reduced glutathione and ascorbic acid has supplementary beneficial effects on boar sperm cryotolerance. *Theriogenology*, 83, 399-407.
- GREEN, C. M., COCKLE, S. M., WATSON, P. F. y FRASER, L. R. 1994. Stimulating effect of pyroglutamylglutamylprolineamide, a prostatic, TRH-related tripeptide, on mouse sperm capacitation and fertilizing ability in vitro. *Mol Reprod Dev*, 38, 215-21.
- GUERIN, P., EL MOUATASSIM, S. y MENEZO, Y. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*, 7, 175-89.
- GUTHRIE, H. D. y WELCH, G. R. 2012. Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology*, 78, 1700-8.
- INABA-K. 2003. Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zool Sci*. 20: 1043.
- ISHIZUKA, Y., NISHIMURA, M., MATSUMOTO, K., MIYASHITA, M., TAKEO, T., NAKAGATA, N., HOSOI, Y. y ANZAI, M. 2013. The influence of reduced glutathione in fertilization medium on the fertility of in vitro-matured C57BL/6 mouse oocytes. *Theriogenology*, 80, 421-6.
- JIMÉNEZ, I., GONZALEZ-MARQUEZ, H., ORTIZ, R., HERRERA, J. A., GARCII, A., BETANCOURT, M. y FIERRO, R. 2003. Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology*, 59, 1171-80.
- LACALLE, E., NÚÑEZ, A., FERNÁNDEZ-ALEGRE, E., CRESPO-FÉLEZ, I., DOMÍNGUEZ, J. C., ALONSO, M. E., GONZÁLEZ-URDIALES, R. y MARTÍNEZ-PASTOR, F. 2021. Cold-Shock Test Is a Practical Method for Selecting Boar Ejaculates Yielding Appropriate Seminal Plasma for Post-Thawing Supplementation. *Animals*, 11, 871.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.

- LEWIS, B. y AITKEN, R. J. 2001. Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited by rat spermatozoa. *Biol Reprod*, 64, 1545-56.
- LI, F., CUI, L., YU, D., HAO, H., LIU, Y., ZHAO, X., PANG, Y., ZHU, H. y DU, W. 2019. Exogenous glutathione improves intracellular glutathione synthesis via the γ -glutamyl cycle in bovine zygotes and cleavage embryos. *J Cell Physiol*, 234, 7384-7394.
- LI, X. X., LEE, K. B., LEE, J. H., KIM, K. J., KIM, E. Y., HAN, K. W., PARK, K. S., YU, J. y KIM, M. K. 2014. Glutathione and cysteine enhance porcine preimplantation embryo development in vitro after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 81, 309-14.
- LISHKO, P. V., BOTCHKINA, I. L., FEDORENKO, A. y KIRICHOK, Y. 2010. Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell*, 140, 327-37.
- LOPEZ-UBEDA, R., GARCIA-VAZQUEZ, F. A., GADEA, J. y MATAS, C. 2017. Oviductal epithelial cells selected boar sperm according to their functional characteristics. *Asian J Androl*, 19, 396-403.
- LÓPEZ-ÚBEDA, R. y MATÁS, C. 2015. An Approach to the Factors Related to Sperm Capacitation Process. *Andrology -Open Access*, 4.
- LU, S. C. 2013. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1830, 3143-53.
- LUÑO, V., LOPEZ-UBEDA, R., GARCIA-VAZQUEZ, F. A., GIL, L. y MATAS, C. 2013. Boar sperm tyrosine phosphorylation patterns in the presence of oviductal epithelial cells: in vitro, ex vivo, and in vivo models. *Reproduction*, 146, 315-24.
- MARTIN-HIDALGO, D., BRAGADO, M. J., BATISTA, A. R., OLIVEIRA, P. F. y ALVES, M. G. 2019. Antioxidants and Male Fertility: from Molecular Studies to Clinical Evidence. *Antioxidants (Basel)*, 8.
- MARTÍNEZ-SÁMANO, J., TORRES-DURÁN, P. V. y JUÁREZ-OROPEZA, M. A. 2011. El Glutathion y Su Asociación Con Las Enfermedades Neurodegenerativas, La Esquizofrenia, El Envejecimiento Y La Isquemia Cerebral. *Revista Bioquímica UNAM*, 30(2), 56-67.
- MATA-CAMPUZANO, M., ALVAREZ-RODRIGUEZ, M., ALVAREZ, M., TAMAYO-CANUL, J., ANEL, L., DE PAZ, P. y MARTINEZ-PASTOR, F. 2015. Post-thawing quality and

- incubation resilience of cryopreserved ram spermatozoa are affected by antioxidant supplementation and choice of extender. *Theriogenology*, 83, 520-8.
- MATÁS, C., VIEIRA, L., GARCÍA-VÁZQUEZ, F., AVILÉS-LÓPEZ, K., LÓPEZ-ÚBEDA, R., CARVAJAL, J. y GADEA, J. 2011. Effects of centrifugation through three different discontinuous Percoll gradients on boar sperm function. *Animal reproduction science*, 127, 62-72.
- MAXWELL, W. M. y JOHNSON, L. A. 1997. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Mol Reprod Dev*, 46, 408-18.
- MICHOS, I., TSANTARLIOTOU, M., BOSCO, C. M., TSOUSIS, G., BASIOURA, A., TZIKA, E. D., TASSIS, P. D., LYMBERPOULOS, A. G. y TSAKMAKIDIS, I. A. 2021. Effect of Boar Sperm Proteins and Quality Changes on Field Fertility. *Animals*, 11, 1813.
- NAVARRETE, F. A., AGUILA, L., MARTIN-HIDALGO, D., TOURZANI, D. A., LUQUE, G. M., ARDESTANI, G., GARCIA-VAZQUEZ, F. A., LEVIN, L. R., BUCK, J., DARSZON, A., BUFFONE, M. G., MAGER, J., FISSORE, R. A., SALICIONI, A. M., GERVASI, M. G. y VISCONTI, P. E. 2019. Transient Sperm Starvation Improves the Outcome of Assisted Reproductive Technologies. *Front Cell Dev Biol*, 7, 262.
- NAVARRETE, F. A., GARCIA-VAZQUEZ, F. A., ALVAU, A., ESCOFFIER, J., KRAPP, D., SANCHEZ-CARDENAS, C., SALICIONI, A. M., DARSZON, A. y VISCONTI, P. E. 2015. Biphasic role of calcium in mouse sperm capacitation signaling pathways. *J Cell Physiol*, 230, 1758-69.
- O'FLAHERTY, C. 2018. *Peroxiredoxin 6: The Protector of Male Fertility*. Antioxidants (Basel), 7.
- OLFATI KARAJI, R., DAGHIGH KIA, H. y ASHRAFI, I. 2014. Effects of in combination antioxidant supplementation on microscopic and oxidative parameters of freeze-thaw bull sperm. *Cell and Tissue Banking*, 15, 461-470.
- OZAWA, M., NAGAI, T., FAHRUDIN, M., KARJA, N. W., KANEKO, H., NOGUCHI, J., OHNUMA, K. y KIKUCHI, K. 2006. Addition of glutathione or thioredoxin to culture medium reduces intracellular redox status of porcine IVM/IVF embryos, resulting in improved development to the blastocyst stage. *Mol Reprod Dev*, 73, 998-1007.

- PEDERSEN, L. J. 2018. Chapter 1 - Overview of commercial pig production systems and their main welfare challenges. In: ŠPINKA, M. (ed.) *Advances in Pig Welfare*. Woodhead Publishing.
- PERAZA-REYES, L. 2008. Catalasa. In: KONIGSBERG, M. (ed.) *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*.
- PERUMAL, P., SELVARAJU, S., SELVAKUMAR, S., BARIK, A. K., MOHANTY, D. N., DAS, S., DAS, R. K. y MISHRA, P. C. 2011. Effect of pre-freeze addition of cysteine hydrochloride and reduced glutathione in semen of crossbred Jersey bulls on sperm parameters and conception rates. *Reprod Domest Anim*, 46, 636-41.
- PETTERS, R. M. y WELLS, K. D. 1993. Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl*, 48, 61-73.
- PINTUS, E., KADLEC, M., JOVIČIĆ, M., SEDMÍKOVÁ, M. y ROS-SANTAELLA, J. L. 2018. Aminoguanidine Protects Boar Spermatozoa against the Deleterious Effects of Oxidative Stress. *Pharmaceutics*, 10, 212.
- QUIROZ, L. E. G. y BAHENA, D. B. C. 2008. Superóxido Dismutasa. In: FAINSTEIN, M. K. (ed.) *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*.
- RALF, D., M, G. J. y JOHANNES, H. 2000. Glutathione metabolism in brain. *European Journal of Biochemistry*, 267, 4912-4916.
- RATH, D., LONG, C. R., DOBRINSKY, J. R., WELCH, G. R., SCHREIER, L. L. y JOHNSON, L. A. 1999. In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *Journal of Animal Science*, 77, 3346-3352.
- ROMAR, R., CANOVAS, S., MATAS, C., GADEA, J. y COY, P. 2019. Pig in vitro fertilization: Where are we and where do we go? *Theriogenology*, 137, 113-121.
- RUEDEN, C. T., SCHINDELIN, J., HINER, M. C., DEZONIA, B. E., WALTER, A. E., ARENA, E. T. y ELICEIRI, K. W. 2017. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, 18, 529.
- RUIZ-DÍAZ, S., GRANDE-PÉREZ, S., ARCE-LÓPEZ, S., TAMARGO, C., OLEGARIO HIDALGO, C. y PÉREZ-CEREZALES, S. 2020. Changes in the Cellular Distribution of Tyrosine Phosphorylation and Its Relationship with the Acrosomal Exocytosis and

- Plasma Membrane Integrity during In Vitro Capacitation of Frozen/Thawed Bull Spermatozoa. *International journal of molecular sciences*, 21, 2725.
- SARRASAGUE, M. M., BARRADO, D. A., ZUBILLAGA, M., HAGER, A., PAOLI, T. D. y BOCCIO, J. 2006. Conceptos actuales del metabolismo del glutati3n. Utilizaci3n de los is3topos estables para la evaluaci3n de su homeostasis. *Acta Bioqu3mica Cl3nica Latinoamericana*, 40 (1), 45-51.
- SCARLATA, E. y O'FLAHERTY, C. 2020. Antioxidant Enzymes and Male Fertility: Lessons from Knockout Models. *Antioxid Redox Signal*, 32, 569-580.
- SHAH, N., SINGH, V., YADAV, H. P., VERMA, M., CHAUHAN, D. S., SAXENA, A., YADAV, S. y SWAIN, D. K. 2017. Effect of reduced glutathione supplementation in semen extender on tyrosine phosphorylation and apoptosis like changes in frozen thawed Haryana bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 182, 111-122.
- SILVA, S. V., SOARES, A. T., BATISTA, A. M., ALMEIDA, F. C., NUNES, J. F., PEIXOTO, C. A. y GUERRA, M. M. 2011. In vitro and in vivo evaluation of ram sperm frozen in tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione. *Reprod Domest Anim*, 46, 874-81.
- SORIANO-3BEDA, C., GARC3A-V3ZQUEZ, F. A., ROMERO-AGUIRREGOMEZCORTA, J. y MAT3S, C. 2017. Improving porcine in vitro fertilization output by simulating the oviductal environment. *Scientific Reports*, 7, 43616.
- SORIANO-UBEDA, C., ROMERO-AGUIRREGOMEZCORTA, J., MATAS, C., VISCONTI, P. E. y GARCIA-VAZQUEZ, F. A. 2019. Manipulation of bicarbonate concentration in sperm capacitation media improves in vitro fertilisation output in porcine species. *J Anim Sci Biotechnol*, 10, 19.
- SPINACI, M., MUCCILLI, V., BUCCI, D., CARDULLO, N., GADANI, B., TRINGALI, C., TAMANINI, C. y GALEATI, G. 2018. Biological effects of polyphenol-rich extract and fractions from an oenological oak-derived tannin on in vitro swine sperm capacitation and fertilizing ability. *Theriogenology*, 108, 284-290.
- STIVAL, C., PUGA MOLINA, L. D. C., PAUDEL, B., BUFFONE, M. G., VISCONTI, P. E. y KRAPF, D. 2016. Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Sperm. In: BUFFONE, M. G. (ed.) *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization*. Cham: Springer International Publishing.

- SUN, W. J., PANG, Y. W., LIU, Y., HAO, H. S., ZHAO, X. M., QIN, T., ZHU, H. B. y DU, W. H. 2015. Exogenous glutathione supplementation in culture medium improves the bovine embryo development after in vitro fertilization. *Theriogenology*, 84, 716-23.
- THANNICKAL, V. J. y FANBURG, B. L. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279, L1005-28.
- TIWARI, M., PRASAD, S., TRIPATHI, A., PANDEY, A. N., SINGH, A. K., SHRIVASTAV, T. G. y CHAUBE, S. K. 2016. Involvement of reactive oxygen species in meiotic cell cycle regulation and apoptosis in mammalian oocytes. *Reactive Oxygen Species*, 1, 110-116.
- TRAVIS, A. J. y KOPF, G. S. 2002. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest*, 110, 731-6.
- TULSIANI-DRP. 2006. Glycan-Modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: An overview of their potential role in sperm maturation. *Mol y Cell Endocr* 250: 58.
- VADNAIS, M. L. y ALTHOUSE, G. C. 2011. Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. *Theriogenology*, 76, 1508-16.
- VISCONTI, P. E. 2009. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 667-8.
- VISCONTI, P. E. 2012. Sperm bioenergetics in a nutshell. *Biol Reprod*, 87, 72.
- VISCONTI, P. E., KRAPF, D., DE LA VEGA-BELTRAN, J. L., ACEVEDO, J. J. y DARSZON, A. 2011. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl*, 13, 395-405.
- WANG, D., KING, S. M., QUILL, T. A., DOOLITTLE, L. K. y GARBERS, D. L. 2003. A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nat Cell Biol*, 5, 1117-22.
- XIE, Y., WU, B., JIN, Y., ZHANG, A., SUN, X., ZHANG, X., GAO, X., DONG, R., LI, H. y GAO, J. 2018. Oocyte-specific deletion of G α induces oxidative stress and deteriorates oocyte quality in mice. *Exp Cell Res*, 370, 579-590.
- YE, J., FLINT, A. P., CAMPBELL, K. H. y LUCK, M. R. 2002. Synchronization of porcine oocyte meiosis using cycloheximide and its application to the study of regulation by cumulus cells. *Reprod Fertil Dev*, 14, 433-42.

- YESTE, M., ESTRADA, E., PINART, E., BONET, S., MIRO, J. y RODRIGUEZ-GIL, J. E. 2014. The improving effect of reduced glutathione on boar sperm cryotolerance is related with the intrinsic ejaculate freezability. *Cryobiology*, 68, 251-61.
- YESTE, M., FLORES, E., ESTRADA, E., BONET, S., RIGAU, T. y RODRIGUEZ-GIL, J. E. 2013. Reduced glutathione and procaine hydrochloride protect the nucleoprotein structure of boar spermatozoa during freeze-thawing by stabilising disulfide bonds. *Reproduction Fertility and Development*, 25, 1036-1050.
- ZHANG, X. G., LIU, Q., WANG, L. Q., YANG, G. S. y HU, J. H. 2016. Effects of glutathione on sperm quality during liquid storage in boars. *Anim Sci J*, 87, 1195-1201.
- ZHOU, Z., NI, C., WU, L., CHEN, B., XU, Y., ZHANG, Z., MU, J., LI, B., YAN, Z., FU, J., WANG, W., ZHAO, L., DONG, J., SUN, X., KUANG, Y., SANG, Q. y WANG, L. 2019. Novel mutations in ZP1, ZP2, and ZP3 cause female infertility due to abnormal zona pellucida formation. *Hum Genet*, 138, 327-337.

14. Productos derivados del trabajo de tesis doctoral

14.1. Artículo de investigación.



Boar sperm incubation with reduced glutathione (GSH) differentially modulates protein tyrosine phosphorylation patterns and reorganization of calcium in sperm, *in vitro* fertilization, and embryo development depending on concentrations

Ernesto Rodríguez-Tobón^a, Reyna Fierro^b, Humberto González-Márquez^b, Francisco A. García-Vázquez^{d, e}, Edith Arenas-Ríos^{c, e}

^a Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, CDMX, México

^b Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Ciencias de la Salud, Unidad Iztapalapa, CDMX, México

^c Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Biología de la Reproducción, Unidad Iztapalapa, CDMX, México

^d Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Campus Internacional de Excelencia para la educación superior e investigación "Campus Mare Nostrum", Universidad de Murcia, Murcia, Spain; Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB-Arrixaca), Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Pigs.
Redox status
ROS
Reproduction
Animal production

ABSTRACT

The sperm in the female's reproductive tract undergo changes to fertilize the oocyte (sperm capacitation). These changes are regulated by redox system. However, some assisted reproductive technologies require sperm capacitation under *in vitro* conditions, though this increases the generation of ROS. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of GSH as an antioxidant agent during the capacitation of boar sperm [evaluated by calcium compartmentalization, tyrosine phosphorylation (Tyr-P), motility, viability, and acrosomal integrity], *in vitro* fertilization (evaluated by penetration, monospermy, and efficiency %), and later embryo development (evaluated by cleavage and blastocyst rates, total number of cells per blastocyst and blastocyst diameter). Four experimental groups with different GSH concentrations (0-control, 0.5, 1, and 5 mM) were formed. When 1-GSH was added to the medium, the percentage of capacitated sperm increased after 4 h of incubation; the localization of Tyr-P was modified at 1 h and 4 h of incubation depending on the GSH concentration. Percentages of total and progressive sperm motility also increased at 4 h of incubation, but only in the 5-GSH group compared to control. Viability, acrosomal integrity, and general Tyr-P (Western blot) not differ among the experimental groups. The addition of GSH during gamete interaction increased penetration, monospermy, and efficiency rates in the 1-GSH group compared to the others. However, the effect of GSH was not observed in cleavage and blastocyst rates compared to the control. In conclusion, adding GSH modulates sperm capacitation (by means of calcium compartmentalization and tyrosine phosphorylation pattern) depending on its concentration, and improves IVF output at 1-GSH during gamete interaction.

1. Introduction

After ejaculation, and during the sperm's transit through the female's reproductive tract, sperm need to undergo a series of modifications called capacitation (Chang, 1951; Darsson et al., 2011; Gervasi and Visconti, 2016). These changes include the rearrangement of membrane proteins and lipids to provide fluidity to the membrane, and activation of the HCO_3^- and Ca^{2+} channels (Gervasi and Visconti, 2016; Vadnais

and Althouse, 2011). The internal increase of these two ions stimulates soluble adenylyl cyclase (ACs), which produces cAMP from ATP, activates the cAMP-dependent protein kinase A (A-PKA) that increases the phosphorylation of tyrosine residues (Tyr-P), sperm hyperactivation, and preparation for the acrosome reaction (AR), events that require losing cholesterol (Cross, 2004; Gervasi and Visconti, 2016), and remodels the cytoskeleton through the polymerisation of actin (Breitbart and Finkelstein, 2018; Gadella et al., 2008). These changes allow the

* Corresponding authors.

E-mail addresses: reyna@xanum.uam.mx (R. Fierro), hgm@xanum.uam.mx (H. González-Márquez), fagarcia@um.es (F.A. García-Vázquez), editharenas2000@yahoo.com.mx (E. Arenas-Ríos).

<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.10.020>

Received 18 April 2020; Received in revised form 15 October 2020; Accepted 20 October 2020

Available online 22 October 2020

0034-5288/© 2020 Published by Elsevier Ltd.

Please cite this article as: Ernesto Rodríguez-Tobón, *Research in Veterinary Science*, <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.10.020>

ARTICLE IN PRESS

E. Rodríguez-Tobón et al.

Research in Veterinary Science xxx (xxxx) xxx

sperm to bind to the oocyte's zona pellucida and initiate the AR (Gadella et al., 2008). Tyr-P is one of the well-known events that takes place during sperm capacitation (Visconti et al., 1995a; Visconti et al., 1995b), which has been described in sperm populations and individual sperm in many mammalian species (reviewed by (Aitken and Nixon, 2013)). However, Tyr-P pattern and distribution on sperm differs between species (Ruiz-Díaz et al., 2020). For example, in the case of porcine species the Tyr-P of the 32 and 18 kDa proteins in sperm seems to play a fundamental role during the process of sperm capacitation (Dube et al., 2005).

Sperm cells depend on oxygen, so their defense mechanisms against oxidation must be in balance with the oxidants they produce. Sperm's ability to generate reactive oxygen species (ROS) has been studied for many years (Aitken, 2017; Ford, 2004) so it is well-known that an excess of ROS is harmful because it causes damage that compromises sperm functionality (Ford, 2004; Guthrie and Welch, 2012). Because of sperm's vulnerability to oxidative stress (Pintus et al., 2018), its correct functioning requires low levels of ROS that stimulate signaling pathways directly associated with capacitation (Aitken and Drevet, 2020; Ford, 2004; Guthrie and Welch, 2012). A ROS-regulated signal transduction pathway previously reported in sperm directly influences Tyr-P (Aitken and Bennetts, 2006; Aitken and Drevet, 2020), where hydrogen peroxide

number of cells per blastocyst and blastocyst diameter).

2. Materials and methods

2.1. Reagents

The reagents that were used in the study were, unless otherwise stated, acquired from Sigma-Aldrich®.

2.2. Biological material

The sperm-rich fraction of ejaculates from boars with proven fertility was used for the experiments of this study. A total of 37 ejaculates (from different boars) were collected by masturbation (gloved hand technique) from the CEFU, S.A. company (Alhama de Murcia, Murcia, Spain). The samples were transported to the laboratory at 17 °C, protected from light. The inclusion criteria established for using the ejaculates were: total motility >70%, viable sperm >90% and morphoanomalies ≤10%.

Ovaries were obtained from prepubertal gilts (El Pozo Alimentación S.A., Alhama de Murcia, Murcia, Spain) and transported to the laboratory in a sterile saline solution at 38.5 °C. Upon arrival, they were washed with cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB; 1%) at 38.5 °C.

(H₂O₂)—an oxidizing agent from dismutation of superoxide anions—can increase Tyr-P by inhibiting the protein tyrosine phosphatase (TP). This enzyme contains a cysteine residue that must remain in a reduced state to preserve its activity. However, when H₂O₂ is present, the TP enzyme is oxidized, loses its activity and favors Tyr-P (Aitken and Bennetts, 2006; Awda et al., 2009; Ford, 2004).

The sperm's antioxidant defense system against ROS is divided into enzymatic and non-enzymatic sub-systems. The former consists of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX), while reduced glutathione (GSH) (Cárdenas-Rodríguez et al., 2008; Perana-Reyes, 2008; Quiros and Bahena, 2008; Thannickal and Fanburg, 2000), peroxiredoxin (PRDX), thioredoxin (TRX), and thioredoxin reductase (TRD) (O'Flaherty, 2018) among other elements, characterize the latter. GPX is one of the antioxidant enzymes responsible for metabolizing endogenous H₂O₂, using GSH as a substrate to produce oxidized glutathione (GSSG), which is subsequently reduced by the enzyme glutathione reductase (GR) to allow GSH to regain its antioxidant activity in a process known as the redox glutathione cycle (Aitken and Roman, 2008; Fernández-Checa, 2008).

In assisted reproductive techniques (ARTs), *in vitro* sperm preparation is essential for proper fertilization, embryo development and successful offspring rates (Navarrete et al., 2019). Oxidative stress is known to play a key role in sperm function during preparation, and research has shown that adding GSH in some situations—such as freezing-thawing sperm—improves sperm function in several species, including boars (Baishya et al., 2018; Estrada et al., 2014; Gadea et al., 2005; Giaretta et al., 2015; Yeste et al., 2014; Yeste et al., 2013), goats (Gadea et al., 2013), rams (Mata-Campuzano et al., 2015; Silva et al., 2011), bulls (Gadea et al., 2008; Olfati Karaji et al., 2014; Perumal et al., 2011; Shah et al., 2017), and humans (Gadea et al., 2011; Ghorbani et al., 2016). During preparation for IVF, sperm are exposed to such oxidizing conditions as light, increased oxygen concentrations, and changes in pH and temperature, in addition to the removal of seminal plasma, which is a source of antioxidants (Arias et al., 2017; Barranco et al., 2015; Domínguez-Rebolledo et al., 2009; Martín-Hidalgo et al., 2019).

Our hypothesis during this study was that adding GSH during *in vitro* sperm preparation for ARTs will improve sperm quality and the ART itself. Our aim was to determine the role of the antioxidant GSH during sperm incubation under capacitation conditions by adding different concentrations (0-control, 0.5, 1 and 5 mM), and measuring (i) the capacitation status (by analyzing calcium compartmentalization, Tyr-P, sperm motility, acrosome integrity and viability); (ii) the output of *in vitro* fertilisation (penetration, monospermy and efficiency); and (iii) subsequent embryo development (cleavage and blastocyst rates, total

2.3. *In vitro* sperm capacitation

The sperm were centrifuged in a two-phase discontinuous gradient of 90 and 45% Percoll® solutions (Pharmacia, Uppsala, Sweden) in BTS Acromax® (Beltsville Thawing Solution) at room temperature. Two mL of each solution were added (first Percoll at 90%, second at 45%, taking care not to mix the phases) to a 10-mL conical tube. Finally, 500 µL of semen were added to the top of the density gradient and centrifuged at 700 g for 30 min at room temperature (Mata et al., 2011).

The sperm concentration was adjusted to 8×10^6 sperm/mL in each experimental group for *in vitro* capacitation. Samples were incubated up to 4 h at 38.5 °C and 5% CO₂ in TALP medium (114.06 mM NaCl, 3.20 mM KCl, 0.50 mM MgCl₂·6H₂O, 10 mM sodium lactate, 0.35 mM NaH₂PO₄·H₂O, 5 mM glucose, 25.07 mM NaHCO₃, 2 mM caffeine, 8 mM calcium lactate·5H₂O, 1 mg/mL PVA, 0.17 mM kanamycin, 0.003 mM phenol red), supplemented with 6 mg/mL of BSA and 0.2 mM of sodium pyruvate. The media was previously equilibrated for 3 h at 38.5 °C/5% CO₂ (Rath et al., 1999). Depending on the experimental group, the TALP medium was supplemented with 0.5, 1.0 or 5.0 mM of GSH for final concentrations of 0.5-GSH, 1-GSH, 5-GSH, respectively (L-glutathione reduced, Sigma-Aldrich® Madrid, Spain). The control did not contain GSH (0-GSH). Sperm evaluations were performed after 1 and 4 h of incubation under capacitating conditions. Also, sperm sample from the same ejaculate, was divided in the same proportion among experimental groups.

2.4. Assessment of sperm capacitation status

Calcium compartmentalization (chlortetracycline CTC-fluorescence staining), Tyr-P (evaluated by immunofluorescence and Western blot), motility, acrosome integrity and viability were evaluated to analyze the sperm's capacitation status.

2.4.1. Evaluation of sperm calcium compartmentalization by chlortetracycline (CTC)

The CTC fluorescence method was performed as described previously (Maxwell and Johnson, 1997). Briefly, the sperm were resuspended in 12% paraformaldehyde and mixed with CTC solution (750 mM CTC in 130 mM NaCl, cysteine 5 mM and 20 mM Tris-HCl adjusted to pH 7.8). Smears were taken on slides and mounted with Dako mounting medium (Agilent®, USA). Samples were observed under fluorescence microscopy (Olympus BX51, Japan, 495/520 nm) counting at least 200 cells per group. Sperm classification was performed using

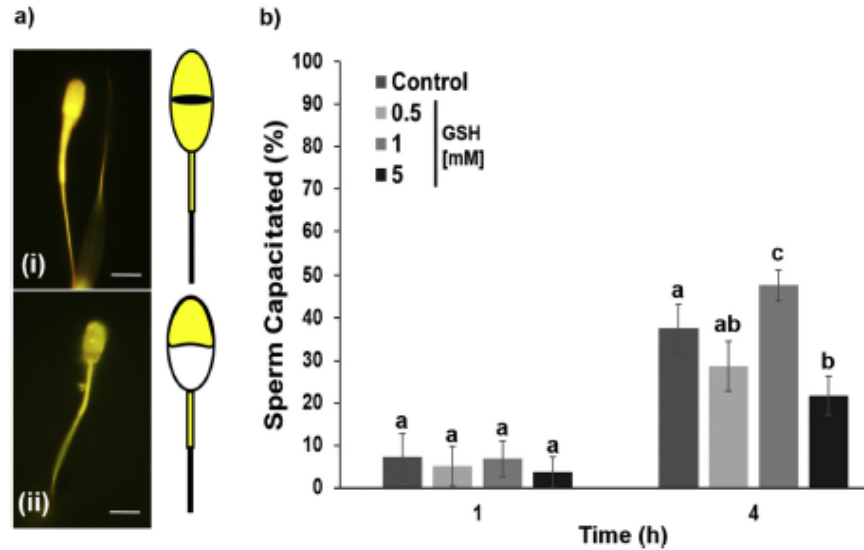


Fig. 1. Sperm capacitation evaluated by the calcium compartmentalization technique (CTC). The sperm were incubated under capacitation conditions for 1 and 4 h in the presence of different GSH concentrations (0-control, 0.5, 1 and 5 mM). a) Representative images of calcium compartmentalization in the sperm: (i) non-capacitated sperm: bright fluorescence over the entire sperm head and positive mid-piece of the tail; (ii) capacitated sperm: fluorescence in the equatorial segment and mid-piece of the tail, but no fluorescence in the post-acrosomal region of the head. Scale bar equivalents to 10 μ m. b) Effect of increasing concentrations of GSH on sperm capacitation at 1 and 4 h. Different letters (a, b, c) indicate significant differences between treatments at the same time ($p < .05$) ($n = 17$). Data are expressed as mean \pm SEM.

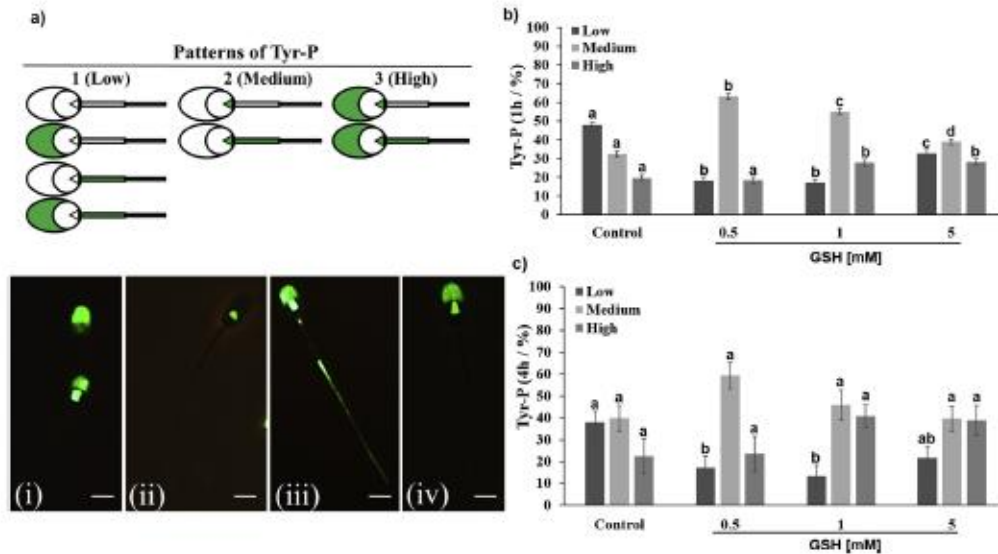


Fig. 2. Immunolocalization of Tyr-P on capacitated sperm after incubation under capacitating conditions with different concentrations of GSH. a) Tyr-P patterns on sperm: Pattern 1 (low level of Tyr-P), sperm without fluorescence or only on the acrosome or only in the flagellum, or both (acrosome and flagellum); Pattern 2 (medium level of Tyr-P), fluorescence in the equatorial sub-segment without staining in the acrosome area and with or without the presence of fluorescence in the flagellum; Pattern 3 (high level of Tyr-P), sperm with fluorescence in the equatorial sub-segment and the acrosome, with or without fluorescence in the flagellum. (i-iv) Images of sperm with different Tyr-P patterns: (i) Patterns 1 and 3; (ii) Pattern 2; (iii-iv) Pattern 3. Scale bar equivalents to 10 μ m. b) and c) Tyr-P levels in boar sperm at 1 and 4 h of incubation in TALP medium, respectively. Different letters (a, b, c, d) indicate statistical differences between experimental groups in the same type of pattern ($p < .05$) ($n = 6$). Data expressed as mean \pm SEM.

the following criteria (Fig. 1a): (i) non-capacitated sperm: bright fluorescence over the entire sperm head and positive mid-piece of the tail; and (ii) capacitated sperm: fluorescence in the equatorial segment and mid-piece of the tail but no fluorescence (dark) in the post-acrosomal region of the head (Cervantes et al., 2008; Ded et al., 2010; Ded et al., 2019; Green et al., 1994; Jimenez et al., 2005).

2.4.2. Evaluation of tyrosine phosphorylation (Tyr-P) sperm location by indirect immunofluorescence

Semen samples were centrifuged and washed with PBS (phosphate-buffered saline, Sigma-Aldrich® Madrid, Spain) for 10 min at 270 g at room temperature (Luño et al., 2013). The sperm were fixed in 2% paraformaldehyde for 60 min at 4 °C, and then centrifuged under the conditions mentioned above, blocked with 2% BSA-PBS, and left to incubate overnight at 4 °C in a humid chamber (Luño et al., 2013). Later, the sperm were centrifuged for 10 min at 270 g at 4 °C and re-suspended in PBS. Smears were taken on slides and allowed to dry in a thermoplate at 38.5 °C. The slides were then incubated for 1 h at 4 °C with anti-Tyr-P monoclonal antibodies as the primary antibody (4G10, Millipore, Temecula, CA, USA), at a dilution of 1:300 in 0.1% BSA in PBS. After that, the slides were washed with PBS (3 × 5 min) and incubated for 1 h at 4 °C with the secondary antibody (goat/anti-mouse-FITC Bio-Rad Laboratories Madrid, Spain) at a dilution of 1:400 in 0.1% BSA. Subsequently, they were washed with PBS (3 × 5 min) and mounted as described previously (Luño et al., 2013). The sperm were evaluated under fluorescence microscopy (Leica® DM4000 Led, Wetlar, Germany, 495/520 nm) counting at least 200 cells per group.

The locations of Tyr-P on the sperm were identified as described previously (Luño et al., 2013) (Fig. 2a): (i) low level of capacitation (pattern 1): sperm without fluorescence or only in the acrosome, mid-piece and/or flagellum; (ii) medium level of capacitation (pattern 2): fluorescence in the equatorial sub-segment without labelling in the acrosome area and with or without the presence of fluorescence in the mid-piece and flagellum; and (iii) high level of capacitation (pattern 3): sperm with fluorescence in the equatorial sub-segment and the acrosome, with or without labelling in the mid-piece and flagellum.

2.4.3. Evaluation of tyrosine phosphorylation (Tyr-P) by immuno-blotting

After incubation under the capacitating conditions, the sperm were centrifuged (Eppendorf Centrifuge 5810R) in 1 mL of PBS at 700 g, then samples were re-suspended in Laemmli sample buffer, heated for 5 min at 100 °C and centrifuged once more. The resulting supernatants were supplemented with 5% β-mercaptoethanol (2-mercaptoethanol Sigma-Aldrich® Madrid, Spain) and heated again for 3 min at 100 °C. Protein extracts equivalent to 2×10^6 sperm were loaded per lane and subjected to SDS-PAGE (Laemmli, 1970) and electro-transfer to immuno-blot PVDF membranes (Bio-Rad Laboratories Madrid, Spain) at 250 mA for 90 min on ice (Navarrete et al., 2015).

The antibodies used were anti-Tyr-P primary antibody (4G10, Millipore, CA, USA) and secondary antibody (goat/anti-mouse-FITC Bio-Rad Laboratories, Madrid, Spain), both diluted to 1:10,000 in 1% BSA and, as the loading control, anti-β-tubulin (T0190, Sigma-Aldrich®, Madrid, Spain) was diluted to 1:5000 in 1% BSA. To this end, PVDF membranes were stripped at 60 °C for 20 min in 2% SDS, 0.74% β-mercaptoethanol, and 62.5 mM Tris, pH 6.5, and then washed five times for 5 min each in T-TBS. Blots were visualized by chemiluminescence (Amersham Imager 600, GE Healthcare) using Pierce® ECL 2 Western Blotting Substrate (30,196, Lumigen Inc., Southfield, MI, USA). The relative amount of signal in each membrane was quantified using ImageQuant TL v8.1 software (GE Healthcare, Life Sciences, Buckinghamshire, UK) (Navarrete et al., 2015; Soriano-Úbeda et al., 2017; Soriano-Úbeda et al., 2019). Molecular weights were expressed in kDa.

2.4.4. Analysis of sperm motility

The motility parameters analyzed were: total and progressive motility (%), curvilinear velocity (VCL, μm/s), rectilinear velocity (VSL,

μm/s), average speed (VAP, μm/s), linearity index (LIN, %), straightness index (STR, %), oscillation index (WOB, %), average amplitude of the lateral displacement of the head (ALH, μm), and beat-cross frequency (BCF, Hz). To determine that a spermatozoon was motile and progressive, the following criteria were considered: VAP > 10 μm/s and STR > 45%, respectively. Motility determinations were made at 25 frames per second for one second (25 images).

A sample of 4 μL was placed in a warmed (38.5 °C) chamber (SpermTrack20®, PROISER R + DSL, Valencia, Spain) and a 10× objective negative-phase in phase-contrast microscope (Leica® DMR, Wetlar, Germany) and digital camera (Basler Vision, Ahrensburg, Germany) were used to perform the evaluation. The motility parameters were determined using the IGAS® software System (PROISER R + DSL, Valencia, Spain).

2.4.5. Evaluation of acrosome integrity and viability

The sperm samples were centrifuged after incubation with PBS for 10 min at 270 g at room temperature with the concentration adjusted to 1×10^6 sperm/mL. Subsequently, 10 μL of the sample were placed on slides for air drying and then permeabilized and fixed with 100% methanol for 10 min at room temperature. After washing in PBS, the sperm were incubated with 200 mg/mL of *Arachis hypogaea* lectin (PNA-FITC, Sigma Aldrich®, Madrid, Spain) for 10 min at 37 °C under darkness, and washed three times for 5 min in PBS. The samples were evaluated under fluorescence microscopy (Leica® DM4000 Led, Wetlar, Germany, 495/520 nm) counting at least 200 cells per group. The spermatozoa were classified as follows: (i) intact acrosome with green fluorescence; and (ii) acrosome damage without fluorescence.

To assess viability, the sperm concentration was adjusted to 10×10^6 sperm/mL and the samples were incubated with 20 μL of 0.5 mg/mL propidium iodide (P-4170 Sigma Aldrich®, Madrid, Spain) for 10 min at 37 °C under darkness. The spermatozoa were classified as: (i) dead sperm: red stained head; or (ii) live sperm: without fluorescence. Samples were evaluated under fluorescence microscopy (Leica® DM4000 Led, Wetlar, Germany, 495/520 nm) counting at least 200 cells per group.

2.5. In vitro maturation of oocytes (IVM)

Once the ovaries were washed, follicles measuring 3–6 mm in diameter were punctured using 10-mL syringes with a sterile 1.2 × 40 mm needle (G18). The porcine follicular fluid (PFF) was collected in 15 mL tubes, placed on a thermal plate (38.5 °C), and allowed to incubate from 5 to 10 min to obtain a pellet. The pellet was washed in PBS at 38.5 °C and deposited on a Nunc® plate. To obtain the oocytes, a stereo-microscope (Nikon SMZ-10A, Japan) and prefabricated glass Pasteur pipette were used to aspirate the oocyte-cumulus cells complex (COCs). Oocytes with homogeneous cytoplasm and at least three layers of cumulus cells were selected. The COCs (50–55 per well) were incubated in 500 μL of NCSU-37a medium (North Carolina State University-37: 108.73 mM NaCl, 25.07 mM NaHCO₃, 4.78 mM KCl, 1.19 mM KH₂PO₄, 1.19 mM MgSO₄·7H₂O, 1.70 mM CaCl₂·2H₂O, 5.55 mM glucose, 1 mM glutamine, 12 mM D-Sorbitol, 0.1 IU penicillin G, 0.034 mM streptomycin, supplemented with 0.57 mM cysteine, 1 mM dibutyltryl cAMP, 5 μg/mL insulin, 50 μM β-mercaptoethanol, 10 IU/mL equine chorionic gonadotropin (eCG; Poligon; Intervet International), 10 IU/mL hCG (Veterin Corion, Divasa Farmavic), and 10% PFF (v/v)) previously balanced for 3 h at 38.5 °C/5% CO₂ for 20–22 h in a Nunc® 4-well dish. Subsequently, the COCs were transferred to 500 μL of NCSU-37b medium free of eCG, hCG and dibutyltryl AMPc, where they were incubated for another 20–22 h under the same conditions (Petters and Wells, 1993).

2.6. In vitro fertilisation (IVF)

After IVM (40–44 h), the cells from the cumulus were removed by

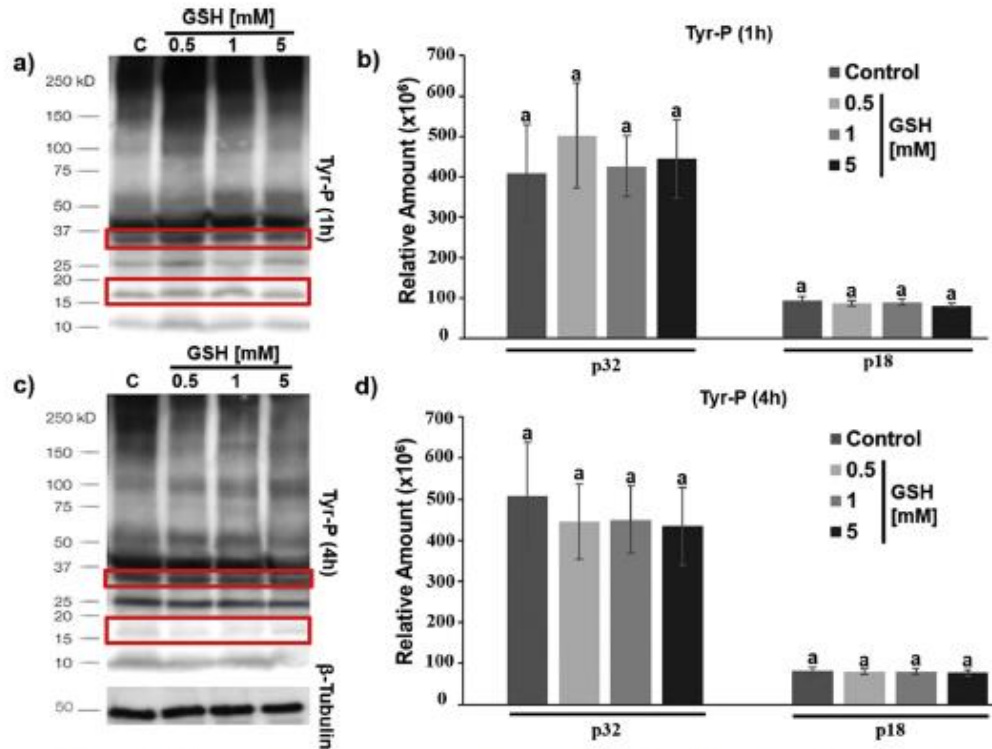


Fig. 3. Effect of different concentrations of GSH during capacitation on sperm Tyr-P analyzed by immuno-blotting; a) and c) show representative Western blots of Tyr-P from capacitated sperm at 1 and 4 h, respectively, using different concentrations of GSH. β -tubulin was used as the loading control. Red boxes indicate Tyr-P analyzed in the p32 and p18 bands. Graphs b) and d) indicate the relative amount of Tyr-P signals in p32 and p18, semi-quantified by ImageQuant TL v. 8.1 software (GE Healthcare, Life Sciences, Buckinghamshire, UK) ($n = 4$). Data expressed as mean \pm SEM. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

mechanical stripping and transferred to another 4-well dish. Prior to gamete co-incubation, the sperm were subjected to Percoll® selection, as described above. The oocytes were co-incubated in TALP with 1×10^4 selected sperm per mL in 0-GSH, 0.5-GSH, 1-GSH and 5-GSH conditions for 4 h at 38.5 °C/5% CO₂. Subsequently, they were transferred to 500 μ L of TALP, GSH-free, for the remaining 14 h of incubation (Petters and Wells, 1993; Rath et al., 1999). After incubation, putative zygotes were stained for evaluation. Briefly, those putative zygotes were washed in PBS supplemented with 1 g/L of polyvinyl alcohol (PBS/PVA) and fixed in glutaraldehyde (0.5% in PBS) for 30 min (Ye et al., 2002). Next, they were washed for 5 min in PBS/PVA and stained with 1% Hoechst (bisbenzimidazole H trihydrochloride 33,342, Sigma-Aldrich®, Madrid, Spain) (Ye et al., 2002) in PBS for 15 min under darkness. Finally, they were mounted on slides and evaluated under fluorescence microscopy (Fig. 5a) (Leica® DM4000 Led, Wetzlar, Germany, 460/490 nm) (Lopez-Ubeda et al., 2017).

The parameters evaluated were: penetration rate (percentage of oocytes penetrated by at least one spermatozoon), monospermy rate (percentage of oocytes penetrated by only one spermatozoon from total penetrated) and IVF efficiency rate (percentage of oocytes that were penetrated and monospermic from total number inseminated).

2.7. In vitro embryo culture

At the end of the 18 h post-insemination period, the putative zygotes were transferred (~30 embryos per group) to NCSU23a medium

(108.73 mM NaCl, 25.07 mM NaHCO₃, 4.78 mM KCl, 1.19 mM KH₂PO₄, 1.19 mM MgSO₄•7H₂O, 1.70 mM CaCl₂•2H₂O, 0.5 mM sodium pyruvate, 5 mM sodium lactate, 1 mM L-Glutamine, 7 mM taurine, 0.1 IU penicillin G, 0.034 mM streptomycin, 0.087 mM insulin and 50 μ M β -Mercaptoethanol), supplemented with 5 mM hipotaurine, 0.4% BSA-FAP, 1% MEM (non-essential amino acids), and 2% BME (essential amino acids), and incubated at 38.5 °C/5% CO₂ and 7% oxygen for 22–24 h (Petters and Wells, 1993; Romar et al., 2019).

Afterwards, the percentage of cleavage was evaluated and only those embryos that presented 2–4 cells were transferred to NCSU23b medium (108.73 mM NaCl, 25.07 mM NaHCO₃, 4.78 mM KCl, 1.19 mM KH₂PO₄, 1.19 mM MgSO₄•7H₂O, 1.70 mM CaCl₂•2H₂O, 5.55 mM D-glucose, 1 mM L-Glutamine, 7 mM taurine, 0.1 IU penicillin G, 0.034 mM streptomycin, 0.087 mM insulin and 50 μ M β -mercaptoethanol), supplemented with hipotaurine (5 mM), BSA-FAP (0.4%), MEM 1%, and BME 2%, for another 120 h under the same conditions to complete 7 days of post-insemination development (Petters and Wells, 1993).

Finally, the blastocysts obtained were photographed with a digital camera (Nikon® D40, Japan) coupled to an inverted microscope (Nikon® Diaphot 300, Japan). The diameter of the blastocysts photographed was evaluated with the ImageJ® program (v. 1.48d open software) (Rueden et al., 2017). Later, the blastocysts were stained by Hoechst (as explained above for the oocytes) to evaluate the total number of cells per blastocyst (under fluorescence microscopy, Leica® DM4000 Led, Wetzlar, Germany, 460/490 nm).

Table 1

Evaluation of sperm motility by the CASA system at 1 (a) and 4 h (b) of sperm incubation under capacitating conditions with different concentrations of GSH. Total and progressive motility (%), curvilinear velocity (VCL, $\mu\text{m/s}$), rectilinear velocity (VSL, $\mu\text{m/s}$), average speed (VAP, $\mu\text{m/s}$), linearity (LIN, %), straightness (STR, %) and oscillation indices (WOB, %), average amplitude of the lateral displacement of the head (ALH, μm), and beat frequency (BCF, Hz) were all analyzed. Different letters (a, b) in the same column indicate statistical differences ($p < .05$) ($n = 9$). Data expressed as mean \pm SEM.

a)						
[nM] GSH	Total Motility (%)	Progressive Motility (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	
Control	54.22 \pm 5.47 ^a	42.00 \pm 4.99 ^a	74.78 \pm 4.21 ^a	41.33 \pm 2.81 ^a	51.33 \pm 2.10 ^a	
0.5	59.56 \pm 5.67 ^a	46.78 \pm 5.38 ^a	71.33 \pm 4.95 ^a	38.00 \pm 4.31 ^a	46.22 \pm 3.34 ^a	
1	58.33 \pm 5.51 ^a	42.33 \pm 5.32 ^a	82.00 \pm 4.59 ^a	47.00 \pm 2.47 ^a	54.89 \pm 3.07 ^a	
5	49.44 \pm 6.27 ^a	33.78 \pm 4.76 ^a	89.67 \pm 6.07 ^a	47.33 \pm 3.79 ^a	58.00 \pm 3.40 ^a	
[nM] GSH	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)	
Control	61.78 \pm 4.12 ^a	83.22 \pm 2.55 ^a	67.89 \pm 3.86 ^a	1.33 \pm 0.17 ^a	12.67 \pm 1.17 ^a	
0.5	51.56 \pm 4.28 ^a	77.89 \pm 3.00 ^a	66.67 \pm 3.57 ^a	1.67 \pm 0.17 ^a	10.44 \pm 0.88 ^a	
1	53.11 \pm 3.72 ^a	81.89 \pm 2.14 ^a	65.78 \pm 3.21 ^a	1.56 \pm 0.18 ^a	12.11 \pm 1.10 ^a	
5	50.89 \pm 4.74 ^a	81.11 \pm 2.61 ^a	64.78 \pm 3.41 ^a	1.78 \pm 0.15 ^a	12.89 \pm 1.37 ^a	
b)						
[nM] GSH	Total Motility (%)	Progressive Motility (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	
Control	20.78 \pm 3.85 ^a	10.33 \pm 1.58 ^a	65.11 \pm 5.47 ^a	23.44 \pm 2.14 ^a	36.00 \pm 2.25 ^a	
0.5	22.56 \pm 1.49 ^{ab}	13.56 \pm 0.99 ^{ab}	75.44 \pm 7.70 ^a	31.89 \pm 2.34 ^a	40.89 \pm 1.06 ^a	
1	25.78 \pm 1.61 ^{ab}	15.11 \pm 1.79 ^{ab}	90.22 \pm 10.69 ^a	32.11 \pm 3.96 ^a	48.11 \pm 3.41 ^a	
5	35.00 \pm 2.48 ^b	19.00 \pm 2.14 ^b	70.44 \pm 5.44 ^a	24.00 \pm 2.46 ^a	43.22 \pm 5.92 ^a	
[nM] GSH	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)	
Control	36.89 \pm 4.86 ^a	64.33 \pm 4.51 ^a	54.11 \pm 4.10 ^a	1.56 \pm 0.69 ^a	9.78 \pm 1.12 ^a	
0.5	45.44 \pm 7.33 ^a	70.67 \pm 6.67 ^a	64.78 \pm 4.72 ^a	1.22 \pm 0.15 ^a	9.67 \pm 0.55 ^a	
1	41.33 \pm 8.76 ^a	66.78 \pm 7.23 ^a	55.56 \pm 6.78 ^a	1.78 \pm 0.28 ^a	11.00 \pm 0.80 ^a	
5	36.56 \pm 7.02 ^a	64.44 \pm 5.76 ^a	54.67 \pm 5.57 ^a	1.33 \pm 0.17 ^a	9.00 \pm 0.73 ^a	

2.6. Statistical analyses

Data were expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). The CTC ($n = 17$), Tyr-P ($n = 10$), viability ($n = 6$) and acrosomal integrity ($n = 4$) data were analyzed using the general procedure for linear repeated measures. Differences were considered statistically significant at $p < .05$. When results were significant, values were compared using the Tukey-HSD multiple comparison post-hoc test. The data on IVP [penetration, monopemy and efficiency ($n = 5$)], and *in vitro* embryo culture [cleavage and blastocyst rates ($n = 5$) (represented as percentages)] were compared using a Chi-squared test, considering Bonferroni correction. The motility data ($n = 9$) were analyzed by a one-way ANOVA. When that ANOVA revealed a significant effect, values were compared by a Tukey-HSD multiple comparison post-hoc test. The diameter of the blastocysts and the number of cells per blastocyst were analyzed by a Kruskal-Wallis test. When differences were observed, the groups were compared with a Tukey's range post-hoc test. Differences were considered statistically significant when $p < .05$. All statistical analyses were performed using RStudio® statistics software version 1.2.5001.

3. Results

3.1. Effect of GSH concentration on sperm capacitation status

3.1.1. Evaluation by calcium compartmentalization by CTC

Changes in calcium compartmentalization (related with the capacitation sperm status) between experimental groups were observed only after 4 h of incubation (Fig. 1b). The highest value was found in 1-GSH group (47.71 \pm 5.62%), significantly different from the rest of the experimental groups (C: 37.53 \pm 5.79%; 0.5-GSH: 28.65 \pm 5.89% and 5-GSH: 21.71 \pm 6.64%, $p < .05$). The sperm calcium compartmentalization was significantly lower in the 5-GSH group compared with the control ($p < .05$).

3.1.2. Immunolocalization of Tyr-P sperm proteins

The results for the Tyr-P patterns in the capacitated sperm are

presented in Fig. 2. After 1 h of incubation (Fig. 2b), a higher level of pattern 2 (medium level of sperm capacitation) was found in all GSH groups (0.5-GSH: 63.17 \pm 1.55%; 1-GSH: 55.00 \pm 1.60% and 5-GSH: 39.00 \pm 1.55%) compared to control (32.50 \pm 1.57%) ($p < .05$), with the 0.5-GSH group having the highest values. However, pattern 3 (high level of sperm capacitation) was significantly greater in groups 1-GSH (27.33 \pm 1.60%) and 5-GSH (28.17 \pm 1.55%), compared to control (19.67 \pm 1.58%) and 0.5-GSH (18.50 \pm 1.60%) ($p < .05$) (Fig. 2b).

After 4 h of incubation, pattern 1 of Tyr-P was significantly lower in the 0.5-GSH (17.10 \pm 5.15%) and 1-GSH (13.34 \pm 5.06%) groups than control (38.00 \pm 5.10%) ($p < .05$), while results for the 5-GSH group (21.60 \pm 5.20%) was statistically similar to all groups. Patterns 2 and 3 were expressed similarly among the experimental groups.

3.1.3. Analysis of sperm Tyr-P by Western blot

Sperm Tyr-P in p32 and p18 were evaluated by immuno-blot (Fig. 3). The Tyr-P signal were similar between different experimental groups after 1 h or 4 h of incubation either in p32 or p18 bands.

3.1.4. Analysis of sperm motility

The results for sperm motility are shown in Table 1. There were no differences among the experimental groups for any of the parameters evaluated after 1 h of incubation (Table 1a). However, after 4 h of incubation (Table 1b), differences were found for both total and progressive motility. In both cases, the highest values corresponded to the 5-GSH group and the lowest to the control group ($p < .05$), while for the 0.5- and 1-GSH groups, total and progressive motility were statistically similar to the control and 5-GSH groups.

3.1.5. Sperm acrosome integrity and viability

Sperm acrosome integrity and viability were not affected by GSH, as no significant differences were found between the experimental groups and the control group after 1 h or 4 h of incubation (Fig. 4a, b).

3.2. Effect of GSH on *in vitro* fertilisation (IVF) and later embryo culture

The effect of GSH on IVP is shown in Fig. 5b. The percentages of

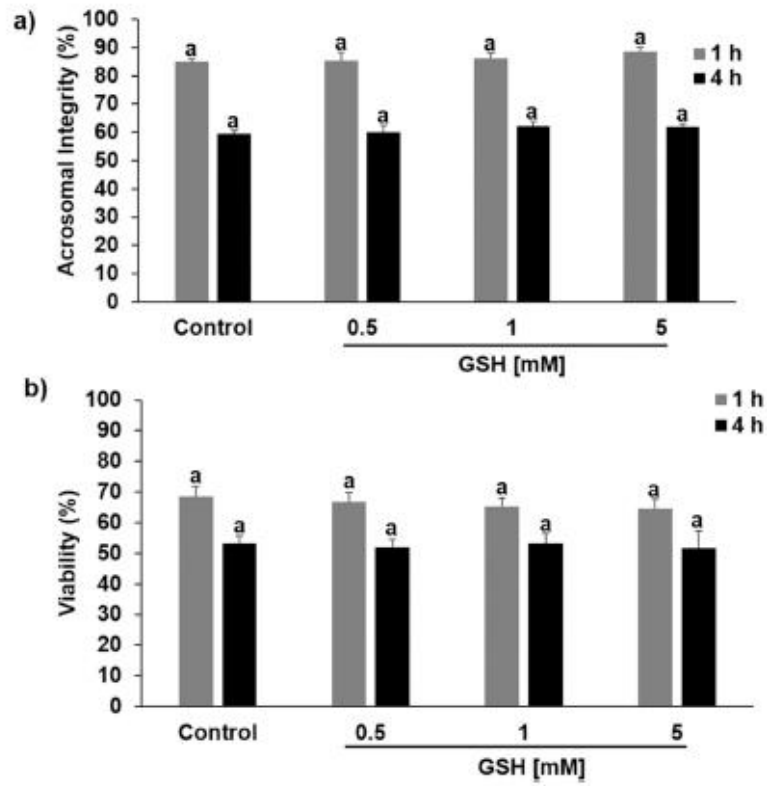


Fig. 4. Evaluation of sperm acrosomal integrity (a) and viability (b) after incubation under capacitating conditions (1 and 4 h) with different concentrations of GSH. Sperm acrosomal integrity ($n = 4$) and viability ($n = 6$) were evaluated by PNA-FITC and propidium iodide, respectively, under fluorescence microscopy. Data expressed as mean \pm SEM.

penetration, monospermy and efficiency in the control group were 32.1%, 48.0% and 15.45%, respectively. These parameters were significantly higher in the 1-GSH group (47.2, 66.3 and 31.25%) compared to the other experimental groups and control ($p < .05$). The cleavage rate of the putative zygotes (Fig. 6a) did not differ significantly among groups (Fig. 6 b). Only a significant increase in the blastocyst rate (%) was observed (Fig. 6b) in the 0.5-GSH (45.2%) group with respect to the 5-GSH (34.1%) group ($p < .05$), but not to the other experimental groups. Regarding the diameter of the blastocysts (μm), the only difference observed was between the 0.5-GSH (300.00 μm) and 5-GSH (357.50 μm) groups ($p < .05$) (Fig. 6c). The total number of cells per blastocyst was similar among all the experimental groups (range: 49.00–58.50) (Fig. 6d).

4. Discussion

In some cases, ARTs require preparing the sperm for artificial insemination or IVF protocols, including sperm capacitation, since this is necessary for successful fertilization. This process has been described as the physiological and biochemical modification of sperm during their transit through the female reproductive tract to acquire fertilizing capacity (Darmon et al., 2011; Navarrete et al., 2015; Olivera et al., 2006; Visconti et al., 2011). This process can be performed *in vitro* but for these sperm changes to develop correctly in this scenario the redox system is of essential importance because oxidative stress is generated during the process of sperm preparation and capacitation (Ford, 2004). During capacitation, sperm produce H_2O_2 (Lewis and Aitken, 2001; Scarlata

and O'Flaherty, 2020), which increases Tyr-P (reviewed by (Scarlata and O'Flaherty, 2020). When ROS production overcomes the sperm's antioxidant defenses detrimental effects have been seen to appear (Agarwal et al., 2014). The present study shows that using GSH as an antioxidant agent modulates the parameters and capacitation status of boar sperm. This modulation was seen to differ depending on the time and the GSH concentration used. Moreover, IVF output and later embryo development were also seen to be modulated by the GSH concentration when added during gamete interaction.

The effects of GSH on such sperm parameters as calcium compartmentalization, Tyr-P location, and motility in our study confirm the modulating role of GSH on sperm capacitation. Calcium is known to play an important role in sperm functionality (Freitas et al., 2017; Navarrete et al., 2015). In this regard, our results show that calcium compartmentalization is modulated by GSH, and that adding 1 mM increased the level of capacitated sperm after 4 h of incubation in capacitating media. In contrast, the treatment of sperm with 5 mM of GSH during 4 h under capacitating conditions exerted an inhibitory effect on capacitation, as analyzed by CTC, though viability and acrosome integrity showed no differences with respect to control. This inhibitory effect when high concentrations of GSH were added agrees with the fact that other antioxidants modulate the capacitation status (Spinaci et al., 2018), given that not only sperm calcium compartmentalization, but also Tyr-P, is essential for sperm capacitation. The importance of Tyr-P location in sperm has been reported previously and associated with capacitation status in different segments of the oviduct (Luño et al., 2015). Research has shown that GSH is synthesized by oviductal epithelial cells and

7

ARTICLE IN PRESS

E. Rodríguez-Tobón et al.

Research in Veterinary Science xxx (xxxx) xxx

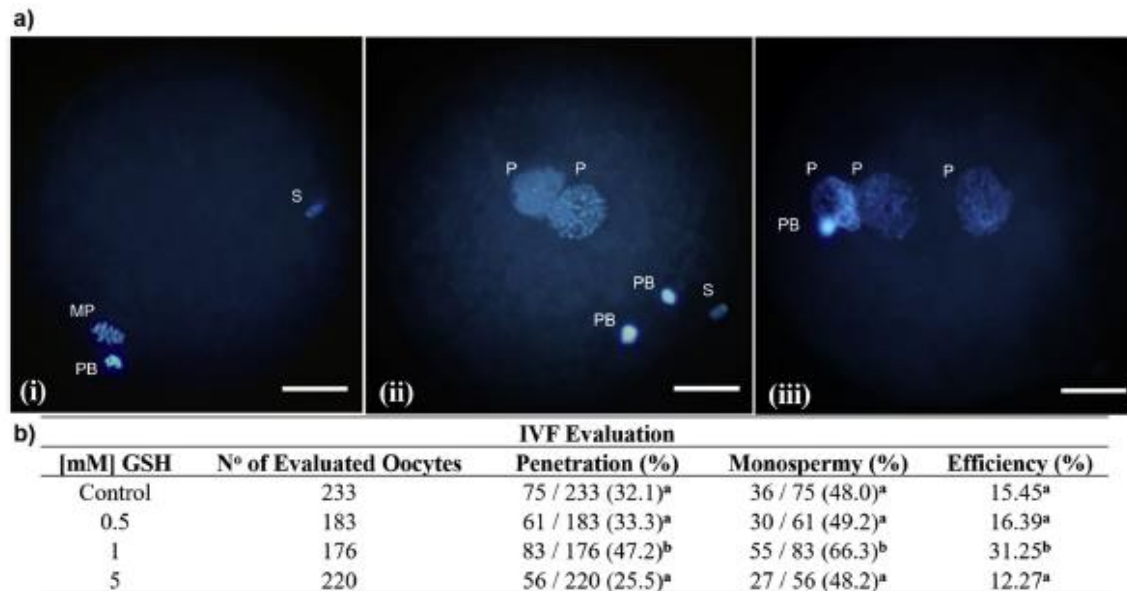


Fig. 5. Effect of the presence of GSH during gamete interaction on IVF output. a) Representative images for IVF evaluation: (i) non-penetrated oocyte (metaphase II); (ii) penetrated oocyte (monospermic); (iii) penetrated oocyte (polyspermic). S – sperm, MP – metaphase plate, PB – polar body, P – pronucleus. Scale bar equivalents to 70 μm . b) Results showing the effect of the different concentrations of GSH on IVF. Different letters in the same column (a, b) indicate statistical differences ($p < .05$) between experimental groups ($n = 5$). The parameters evaluated were: penetration rate (percentage of oocytes penetrated by at least one spermatozoon), monospermy rate (percentage of oocytes penetrated by only one spermatozoon from total penetrated) and IVF efficiency rate (percentage of oocytes that were penetrated and monospermic from total number inseminated).

secreted into the tubal fluid as well (Gardiner et al., 1998). This explains that sperm capacitation may be modulated by GSH secretions in the oviduct. The present study showed that the effect of adding different concentrations of GSH affects Tyr-P sperm location after both 1 h and 4 h of incubation. All these results indicate a biphasic effect on the redistribution of intracellular calcium and Tyr-P location in sperm that is dependent on the concentration of GSH. Therefore, we can hypothesize that under *in vitro* capacitation conditions, a low concentration of GSH (0.5 and 1 mM) can balance ROS production and, therefore, lead to adequate sperm capacitation without impairing viability or acrosome integrity. At a higher concentration of GSH (5 mM), however, ROS production may be prevented or reduced, thus impeding the process of sperm capacitation. This finding could concur with the higher total and progressive motility observed after 4 h of incubation when 5 mM of GSH was added, compared to the control group. Other antioxidants are known to protect cell mitochondria from lipid peroxidation by oxygen-free radicals (Guo et al., 2013; Jia et al., 2018), so we hypothesized that, in addition to inhibiting or delaying sperm capacitation, a higher concentration of GSH may protect the sperm's mitochondria.

It is important to note that sperm capacitation results in the ability of sperm to undergo AR in the presence of the zona pellucida (Stival et al., 2016). CTC evaluated by fluorescence microscopy is a good predictor of the percentage of AR after ZP-induction (Ded et al., 2019). In this sense, the IVF results obtained in the present study concur by showing higher IVF efficiency when 1 mM of GSH was used. Additionally, the oocytes were exposed to GSH during gamete co-incubation, so our fertilization results would also have been influenced by this. GSH supplementation has been shown to reduce excessive ROS levels in porcine oocytes (Zhou et al., 2019), and may prevent lipid peroxidation in the oocyte membrane by removing excess ROS in the medium (Biggers, 1990). Similar results have been obtained in other species—such as mice—where adding 1 mM of GSH in IVF media, but not a higher concentration, improved

fertility rates (Ishizuka et al., 2013).

Our results indicate that GSH supplementation during gamete co-incubation had no effect on cleavage or blastocyst development. Because early-stage embryos are less resistant to oxidative stress (Guerin et al., 2001), incorporating antioxidant agents not only during gamete co-incubation but also in the culture media may be beneficial by increasing the development rate of embryos. Other authors have demonstrated that adding GSH directly to the embryo culture media after IVF (Osawa et al., 2006) or ICSI (Li et al., 2014) improves blastocyst development rates. The only difference obtained in embryo development in the present study was that GSH at 5 mM decreased blastocyst rates and the diameter of the blastocysts compared to adding 0.5 mM. These GSH concentration-dependent differences have been observed in other studies, indicating that high GSH concentrations in the media could have a detrimental effect on embryo development (Ishizuka et al., 2013). The explanation of this phenomenon, however, is still unclear, and excessive GSH concentrations may be detrimental to developmental competence (Ishizuka et al., 2013).

5. Conclusion

The addition of GSH, modulates protein tyrosine phosphorylation patterns and reorganization of calcium in boar sperm in a dose-dependent manner. Furthermore, the efficiency of IVF and the subsequent development of the embryo, are also modulated by the concentrations of GSH when they are added during gamete interaction.

Declaration of Competing Interest

The authors declared that they don't have any financial or personal relationship with other people or organization that could inappropriately influence or bias the content of this research.

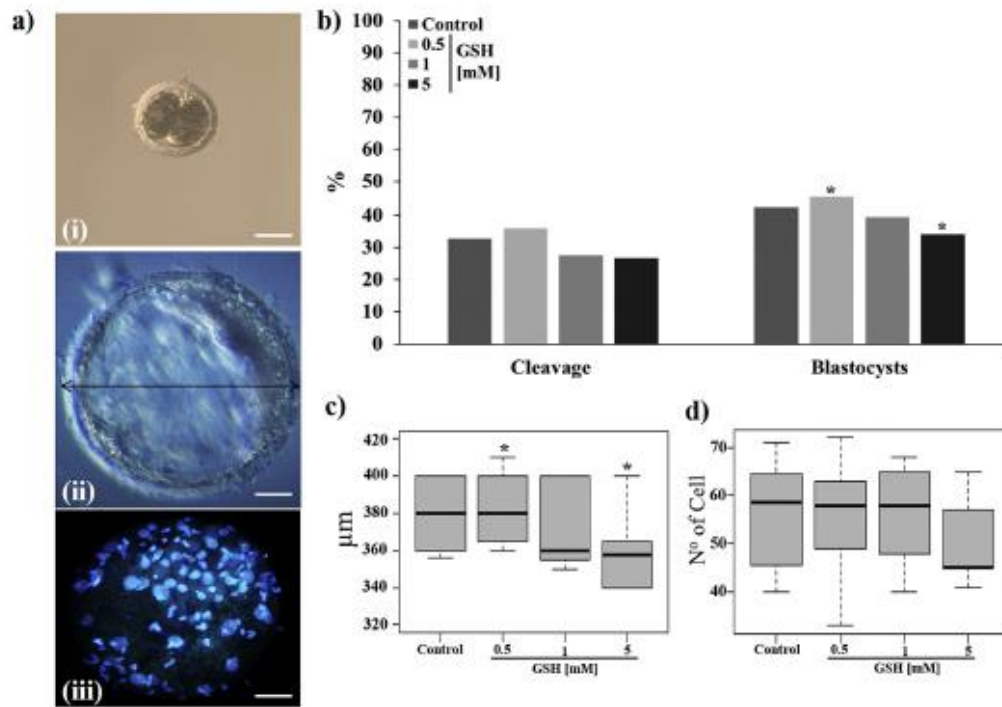


Fig. 6. Effect of the presence of GSH during gamete interaction on *in vitro* embryo culture. a) (i) Embryo in the 2-cell stage evaluated at 42-44 h post-insemination (bright field microscope); (ii) measure of blastocyst diameter using ImageJ software; (iii) expanded blastocyst stained with Hoechst 33342 (fluorescence microscope). Scale bar equivalents to 70 μm . b) Percentage of cleavage and total blastocysts. c) Diameter of the blastocysts (μm); and d) total number of cells per blastocyst. Number of zygotes evaluated by treatments: control (164); 0.5-GSH (172); 1-GSH (156); 5-GSH (165). The percentage of blastocysts was calculated from cleaved embryos. *Indicates statistically significant differences between experimental groups ($p < .05$) ($n = 5$).

Acknowledgment

This research was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and European Regional Development Fund (FEDER) (AOL2015-66341-R), the Séneca Foundation of Murcia (20040/GERM/16), the Spanish Ministry of Science and Innovation (PID2019-106300RB-I00 / AEI /10.1303/501100011033) and CONACYT [Mexico (CVU / Scholarship): 570390/302854, N°: 458756]. The authors would also like to thank Dr. Ahieser Rodríguez Tobón for her assistance in the advice at RStudio® Statistics software, to Juan Antonio Carvajal for collecting the biological material necessary for the study, and finally, to Chiara Luongo and Gabriela Garrappa for their advice in the laboratory.

References

- Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., du Plessis, S.S., 2014. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J. Men's Health* 32 (1), 17.
- Aitken, R.J., 2017. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol. Reprod. Dev.* 84, 1039-1052.
- Aitken, R.J., Bennetts, L., 2006. Reactive oxygen species: Friend or foe. In: Jonge, C.J.D., Barratt, C.L.R. (Eds.), *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. The Edinburgh Building, Cambridge.
- Aitken, R.J., Drevetz, J.R., 2020. The importance of oxidative stress in determining the functionality of mammalian spermatozoa: a two-edged sword. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 9.
- Aitken, R.J., Nixon, B., 2013. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Mol. Hum. Reprod.* 19, 785-793.
- Aitken, R.J., Roman, S.D., 2008. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 1, 15-24.
- Arias, M.E., Andara, K., Briones, E., Felmer, R., 2017. Bovine sperm separation by swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): effect on sperm quality, function and gene expression. *Reprod. Biol.* 17, 126-132.
- Awda, B.J., Mackenzie-Bell, M., Bühr, M.M., 2009. Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biol. Reprod.* 81, 553-561.
- Baishya, S.K., Biswas, R.K., Govindasamy, K., Deka, B.C., Sinha, S., Singh, M., 2018. Effect of reduced glutathione, water soluble vitamin E analogue and Butylated Hydroxytoluene on the post thaw characteristics of boar spermatozoa. *Cryo-Letters* 39, 227-234.
- Barranco, I., Tvarijonavičiute, A., Perez-Patino, C., Parrilla, I., Cerón, J.J., Martínez, E.A., Rodríguez-Martínez, H., Roca, J., 2015. High total antioxidant capacity of the porcine seminal plasma (SP-TAC) relates to sperm survival and fertility. *Sci. Rep.* 5, 18538.
- Biggers, J.D., 1998. Reflections on the culture of the preimplantation embryo. *Int. J. Develop. Biol.* 42, 879-884.
- Breitbart, H., Finkelstein, M., 2018. Actin cytoskeleton and sperm function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 506, 373-377.
- Cárdenas-Rodríguez, N., Medina-Campos, O.N., Pedraza-Chaverri, J., 2008. Glutathione peroxidases: Una familia de enzimas. In: Fainstein, M.K. (Ed.), *Radicales libres y Estrés Oxidativo. Aplicaciones Médicas*, p. 201.
- Corvantes, M.I., Arenas-Ríos, E., Leon-Galvan, M.A., Lopez-Wilchis, R., Ambríz, D., Rosado, A., 2008. Spermatozoa epididymal maturation in the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Syst Biol Reprod Med* 54, 196-204.
- Chang, M., 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168, 997-998.
- Cross, N.L., 2004. Reorganization of lipid rafts during capacitation of human sperm. *Biol. Reprod.* 71, 1367-1373.
- Darzon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., Trevino, C.L., 2011. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol. Rev.* 91, 1305-1355.
- Deed, L., Dostalova, P., Dorosh, A., Dvorakova-Hortova, K., Peňakova, J., 2010. Effect of estrogens on boar sperm capacitation in vitro. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8, 87.
- Deed, L., Dostalova, P., Zatecka, E., Dorosh, A., Komrskova, K., Peňakova, J., 2019. Fluorescent analysis of boar sperm capacitation process in vitro. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 17, 109.
- Dominguez-Rebolledo, A.E., Fernandez-Santos, M.R., Garcia-Alvarez, O., Maroto-Morales, A., Garde, J.J., Martinez-Pastor, F., 2009. Washing increases the susceptibility to exogenous oxidative stress in red deer spermatozoa. *Theriogenology* 72, 1073-1084.
- Dube, C., Leclerc, P., Baba, T., Reyes-Moreno, C., Bailey, J.L., 2005. The proacrosin binding protein, sp32, is tyrosine phosphorylated during capacitation of pig sperm. *J. Androl.* 26, 519-528.
- Estrada, E., Rodríguez-Gil, J.E., Rocha, L.G., Balasch, S., Bonet, S., Yeste, M., 2014. Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione increases fertility and prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen. *Andrology* 2, 88-99.
- Fernández-Checa, G.R.C., 2008. Glutathión. In: Fainstein, M.K. (Ed.), *Radicales Libres y Estrés Oxidativo. Aplicaciones Médicas, Manual Moderno ed.*, p. 253.
- Ford, W.C., 2004. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum. Reprod. Update* 10, 387-399.
- Freitas, M.J., Vijayaraghavan, S., Fardilha, M., 2017. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biol. Reprod.* 96, 2-12.
- Gadea, J., Gumbao, D., Matas, C., Romar, R., 2005. Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. *J. Androl.* 26, 749-756.
- Gadea, J., Gumbao, D., Cánovas, S., García-Vázquez, F.A., Grullón, L.A., Gardón, J.C., 2008. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. *Int. J. Androl.* 31, 40-49.
- Gadea, J., Molla, M., Selles, E., Marco, M.A., Garcia-Vazquez, F.A., Gardon, J.C., 2011. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology* 62, 40-46.
- Gadea, J., Gumbao, D., Gómez-Giménez, B., Gardón, J.C., 2013. Supplementation of the thawing medium with reduced glutathione improves function of frozen-thawed goat spermatozoa. *Reprod. Biol.* 13, 24-33.
- Gadella, T.P., Boerke, A., Brewis, L.A., 2008. Sperm head membrane reorganization during capacitation. *Dev. Biol.* 52, 473.
- Gardiner, C.S., Salmen, J.J., Brandt, C.J., Stover, S.K., 1998. Glutathione is present in reproductive tract secretions and improves development of mouse embryos after chemically induced glutathione depletion. *Biol. Reprod.* 59, 431-436.
- Gervasi, M.G., Visconti, P.E., 2016. Chang's meaning of capacitation: a molecular perspective. *Mol. Reprod. Dev.* 83, 860-874.
- Ghorbani, M., Vatanejad, A., Khodadadi, I., Amiri, I., Tavilani, H., 2016. Protective effects of glutathione supplementation against oxidative stress during Matís, C., Vieira, L., García-Vázquez, F., Avilés-López, K., López-Úbeda, R., Carvajal, J., Gadea, J., 2011. Effects of centrifugation through three different discontinuous Percoll gradients on boar sperm function. *Anim. Reprod. Sci.* 127, 62-72.
- Maxwell, W.M., Johnson, L.A., 1997. Chlorotetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.* 46, 408-418.
- Navarrete, F.A., Garcia-Vazquez, F.A., Alvau, A., Escoffier, J., Krapf, D., Sanchez-Cardenas, C., Salicioni, A.M., Darzon, A., Visconti, P.E., 2015. Biphasic role of calcium in mouse sperm capacitation signaling pathways. *J. Cell. Physiol.* 230, 1758-1769.
- Navarrete, F.A., Aguila, L., Martin-Hidalgo, D., Tourzani, D.A., Luque, G.M., Ardestani, G., Garcia-Vazquez, F.A., Levin, L.R., Buck, J., Darzon, A., Buffone, M.G., Mager, J., Fissore, R.A., Salicioni, A.M., Gervasi, M.G., Visconti, P.E., 2019. Transient sperm starvation improves the outcome of assisted reproductive technologies. *Front. Cell Dev. Biol.* 7, 262.
- O'Flaherty, C., 2018. Peroxiredoxin 6: the protector of male fertility. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 7.
- Ofitai Karaji, R., Daghighi Kia, H., Ashrafi, I., 2014. Effects of in combination antioxidant supplementation on microscopic and oxidative parameters of freeze-thaw bull sperm. *Cell Tissue Bank* 15, 461-470.
- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., Giraldo, C., 2006. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 19, 426-436.
- Ozawa, M., Nagai, T., Fahrudin, M., Karja, N.W., Kaneko, H., Noguchi, J., Ohnuma, K., Kikuchi, K., 2006. Addition of glutathione or thioredoxin to culture medium reduces intracellular redox status of porcine IVM/TVF embryos, resulting in improved development to the blastocyst stage. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 998-1007.
- Peraza-Reyes, L., 2008. *Catalasa*. In: Konigsberg, M. (Ed.), *Radicales Libres y Estrés Oxidativo. Aplicaciones Médicas*, p. 183.
- Perumal, P., Selvaraju, S., Selvakumar, S., Barik, A.K., Mohanty, D.N., Das, S., Das, R.K., Mishra, P.C., 2011. Effect of pre-freeze addition of cysteine hydrochloride and reduced glutathione in semen of crossbred Jersey bulls on sperm parameters and conception rates. *Reprod. Domest. Anim. Zuchtigehene* 46, 636-641.
- Pettors, R.M., Wells, K.D., 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 48, 61-73.
- Pintus, E., Kadlec, M., Jovičić, M., Sedmíková, M., Ros-Santabella, J.L., 2018. Aminoguanidine protects boar spermatozoa against the deleterious effects of oxidative stress. *Pharmaceutics* 10, 212.

9

ARTICLE IN PRESS

E. Rodríguez-Tobón et al.

Research in Veterinary Science xxx (xxxx) xxx

- cryopreservation of human spermatozoa. *Cryo-Letters* 37, 34–40.
- Giaretta, E., Estrada, E., Bucci, D., Spinaci, M., Rodriguez-Gil, J.E., Yeste, M., 2015. Combining reduced glutathione and ascorbic acid has supplementary beneficial effects on boar sperm cryotolerance. *Theriogenology* 83, 399–407.
- Green, C.M., Cockle, S.M., Watson, P.F., Fraser, L.R., 1994. Stimulating effect of pyroglutamylglutamylprolineamide, a prostatic, TRH-related tripeptide, on mouse sperm capacitation and fertilizing ability in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 38, 215–221.
- Guerin, P., El Moustassim, S., Senezo, Y., 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update* 7, 175–189.
- Guo, J., Zhang, Y., Zeng, L., Liu, J., Liang, J., Guo, G., 2013. Salvianic acid A protects L-O2 cells against gamma-irradiation-induced apoptosis via the scavenging of reactive oxygen species. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 35, 117–130.
- Guthrie, H.D., Welch, G.R., 2012. Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology* 78, 1700–1708.
- Ishizuka, Y., Nishimura, M., Matsumoto, K., Miyashita, M., Takeo, T., Nakagata, N., Hosoi, Y., Anzai, M., 2013. The influence of reduced glutathione in fertilization medium on the fertility of in vitro-matured C57BL/6 mouse oocytes. *Theriogenology* 80, 421–426.
- Jia, D., Li, T., Chen, X., Ding, X., Chai, Y., Chen, A.F., Zhu, Z., Zhang, C., 2018. Salvianic acid A sodium protects HUVEC cells against tert-butyl hydroperoxide induced oxidative injury via mitochondria-dependent pathway. *Chem. Biol. Interact.* 279, 234–242.
- Jimenez, I., Gonzalez-Marquez, H., Ortiz, R., Herrera, J.A., Garcia, A., Betancourt, M., Fierro, R., 2003. Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology* 59, 1171–1180.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lewis, B., Aitken, R.J., 2001. Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited by rat spermatozoa. *Biol. Reprod.* 64, 1545–1556.
- Li, X.X., Lee, K.B., Lee, J.H., Kim, K.J., Kim, E.Y., Han, K.W., Park, K.S., Yu, J., Kim, M.K., 2014. Glutathione and cysteine enhance porcine preimplantation embryo development in vitro after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 81, 309–314.
- Lopez-Ubeda, R., Garcia-Vazquez, F.A., Gadea, J., Matas, C., 2017. Oviductal epithelial cells selected boar sperm according to their functional characteristics. *Asian J. Androl.* 19, 396–403.
- Luño, V., Lopez-Ubeda, R., Garcia-Vazquez, F.A., Gil, L., Matas, C., 2013. Boar sperm tyrosine phosphorylation patterns in the presence of oviductal epithelial cells: in vitro, ex vivo, and in vivo models. *Reprod. (Cambridge, England)* 146, 315–324.
- Martin-Hidalgo, D., Bragado, M.J., Batista, A.R., Oliveira, P.F., Alves, M.G., 2019. Antioxidants and male fertility: from molecular studies to clinical evidence. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 8.
- Mata-Campuzano, M., Alvarez-Rodriguez, M., Alvarez, M., Tamayo-Casul, J., Anel, L., de Paz, P., Martinez-Pastor, F., 2015. Post-thawing quality and incubation resilience of cryopreserved ram spermatozoa are affected by antioxidant supplementation and choice of extender. *Theriogenology* 83, 520–528.
- Quiroz, L.E.G., Bahena, D.B.C., 2008. Superóxido Dismutasa. In: Fainstein, M.K. (Ed.), *Radicales Libres y Estrés Oxidativo. Aplicaciones Médicas*, p. 169.
- Rath, D., Long, C.R., Dobrinsky, J.R., Welch, G.R., Schreiber, L.L., Johnson, L.A., 1999. In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *J. Anim. Sci.* 77, 3346–3352.
- Romar, R., Canovas, S., Matas, C., Gadea, J., Coy, P., 2019. Pig in vitro fertilization: where are we and where do we go? *Theriogenology* 137, 113–121.
- Rueden, C.T., Schindelin, J., Hiner, M.C., DeZonia, B.E., Walter, A.E., Arena, E.T., Elliceiri, K.W., 2017. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 18, 529.
- Ruiz-Díaz, S., Grande-Pérez, S., Arco-López, S., Tamaño, C., Olegario Hidalgo, C., Pérez-Cereales, S., 2020. Changes in the cellular distribution of tyrosine phosphorylation and its relationship with the Acrosomal exocytosis and plasma membrane integrity during in vitro capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2725.
- Scarlata, E., O'Flaherty, C., 2020. Antioxidant enzymes and male fertility: lessons from knockout models. *Antioxid. Redox Signal.* 32, 569–580.
- Shah, N., Singh, V., Yadav, H.P., Verma, M., Chauhan, D.S., Saxena, A., Yadav, S., Swain, D.K., 2017. Effect of reduced glutathione supplementation in semen extender on tyrosine phosphorylation and apoptosis like changes in frozen thawed Hariana bull spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 182, 111–122.
- Silva, S.V., Soares, A.T., Batista, A.M., Almeida, F.C., Nunes, J.F., Peixoto, C.A., Guerra, M.M., 2011. In vitro and in vivo evaluation of ram sperm frozen in tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione. *Reprod. Domest. Anim. Zuchtthygiene* 46, 874–881.
- Soriano-Úbeda, C., García-Vázquez, F.A., Romero-Aguirregomezcorta, J., Matás, C., 2017. Improving porcine in vitro fertilization output by simulating the oviductal environment. *Sci. Rep.* 7, 43616.
- Soriano-Úbeda, C., Romero-Aguirregomezcorta, J., Matas, C., Visconti, P.E., Garcia-Vazquez, F.A., 2019. Manipulation of bicarbonate concentration in sperm capacitation media improves in vitro fertilisation output in porcine species. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 10, 19.
- Spinaci, M., Muccilli, V., Bucci, D., Cardullo, N., Gadani, B., Tringali, C., Tamanini, C., Galeati, G., 2018. Biological effects of polyphenol-rich extract and fractions from an oenological oak-derived tannin on in vitro swine sperm capacitation and fertilizing ability. *Theriogenology* 108, 284–290.
- Stival, C., Fuga Molina, L.D.C., Paudel, B., Buffone, M.G., Visconti, P.E., Krapf, D., 2016. Sperm capacitation and acrosome reaction in mammalian sperm. In: Buffone, M.G. (Ed.), *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization*. Springer International Publishing, Cham, pp. 93–106.
- Thannickal, V.J., Fanburg, B.L., 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Phys. Lung Cell. Mol. Phys.* 279, L1005–L1028.
- Vadnaia, M.L., Althouse, G.C., 2011. Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. *Theriogenology* 76, 1508–1516.
- Visconti, P.E., Bailey, J.L., Moore, G.D., Pan, D., Olds-Clarke, P., Kopf, G.S., 1995a. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state

10

ARTICLE IN PRESS

E. Rodríguez-Tobón et al.

Research in Veterinary Science xxx (xxxx) xxx

- and protein tyrosine phosphorylation. *Development (Cambridge, England)* 121, 1129–1137.
- Visconti, P.E., Moore, G.D., Bailey, J.L., Leclerc, P., Connors, S.A., Pan, D., Olds-Clarke, P., Kopf, G.S., 1995b. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development (Cambridge, England)* 121, 1139–1150.
- Visconti, P.E., Krapf, D., de la Vega-Beltran, J.L., Acevedo, J.J., Darszon, A., 2011. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J. Androl.* 13, 395–405.
- Ye, J., Flint, A.P., Campbell, K.H., Luck, M.R., 2002. Synchronization of porcine oocyte meiosis using cycloheximide and its application to the study of regulation by cumulus cells. *Reprod. Fertil. Dev.* 14, 433–442.
- Yeste, M., Flores, E., Estrada, E., Bonet, S., Rigau, T., Rodriguez-Gil, J.E., 2013. Reduced glutathione and procaine hydrochloride protect the nucleoprotein structure of boar spermatozoa during freeze-thawing by stabilising disulfide bonds. *Reprod. Fertil. Dev.* 25, 1036–1050.
- Yeste, M., Estrada, E., Pinart, E., Bonet, S., Miro, J., Rodriguez-Gil, J.E., 2014. The improving effect of reduced glutathione on boar sperm cryotolerance is related with the intrinsic ejaculate freezeability. *Cryobiology* 68, 251–261.
- Zhou, Z., Ni, C., Wu, L., Chen, B., Xu, Y., Zhang, Z., Mu, J., Li, B., Yan, Z., Fu, J., Wang, W., Zhao, L., Dong, J., Sun, X., Kuang, Y., Sang, Q., Wang, L., 2019. Novel mutations in ZP1, ZP2, and ZP3 cause female infertility due to abnormal zona pellucida formation. *Hum. Genet.* 138, 327–337.

14.2. Capítulo de libro

El espermatozoide: una mirada desde México

EDITH ARENAS RÍOS
GISELA FUENTES MASCORRO
Coordinadoras



Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca, México
Universidad Autónoma Metropolitana, México
Universidad Nacional Autónoma de México, México
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México
Universidad Autónoma de Tlaxcala, México
Universidad Autónoma del Estado de México, México
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Dr. Manuel Velasco
Suárez", México
Instituto de Geriátría, México
Universidad de Syracuse, Estados Unidos de Norteamérica

Citar los capítulos del libro de la siguiente forma:
Nombre del autor (es). (Año). Nombre del capítulo. *Nombre del libro* (pp. - pp.).
Lugar de edición: Editorial

La presente edición fue financiada parcialmente con recursos
del PFCE 2018.

El espermatozoide: una mirada desde México

© 2019

D. R. © Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca

Primera edición, 2019

ISBN versión electrónica: 978-607-9061-69-2

ISBN versión impresa: 978-607-9061-68-5

Servicios editoriales Scriptus
www.scriptus.com.mx

Impreso en México

EL PAPEL DEL GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH) EN EL PROCESO DE CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

Ernesto Rodríguez Tobón,¹
Reyna Carmen Fierro Pastrana,²
Humberto González Márquez,²
Pablo Gustavo Damián Matsumura² y
Edith Arenas Ríos²

¹ Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-I Unidad Iztapalapa, San Rafael Añirre no. 186, col. Vicentina, Iztapalapa, 09340, México. Correo electrónico: rotoera@hotmail.com
² División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-I, Unidad Iztapalapa, México.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00115

Matrícula: 2163802473

Efecto del estado REDOX en la capacidad fertilizante de espermatozoides de cerdo *Sus scrofa domesticus*.



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 9:00 horas del día 31 del mes de agosto del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

- DRA. EDITH ARENAS RIOS
- DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ
- DR. FRANCISCO ALBERTO GARCIA VAZQUEZ
- DR. JULIO CESAR CHAVEZ ZAMORA
- DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: ERNESTO RODRIGUEZ TOBON

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

ERNESTO RODRIGUEZ TOBON
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. EDITH ARENAS RIOS

VOCAL

DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ

VOCAL

DR. FRANCISCO ALBERTO GARCIA VAZQUEZ

VOCAL

DR. JULIO CESAR CHAVEZ ZAMORA

SECRETARIA

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella