



BRUNA RESENDE CHAVES

**EFFECTS OF BOVINE SERUM ALBUMIN (BSA) AND
BICARBONATE ON THE ACHIEVEMENT OF IN VITRO
CAPACITATION AND SUBSEQUENT PROGESTERONE-
INDUCED ACROSOME REACTION IN BOAR
SPERMATOZOA**

**LAVRAS-MG
2019**

BRUNA RESENDE CHAVES

**EFFECTS OF BOVINE SERUM ALBUMIN (BSA) AND BICARBONATE ON THE
ACHIEVEMENT OF IN VITRO CAPACITATION AND SUBSEQUENT
PROGESTERONE-INDUCED ACROSOME REACTION IN BOAR
SPERMATOOZOA.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Fisiologia e Metabolismo, para a obtenção do título de Doutora.

Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo

Orientador

Prof. Dr. Marc Yeste Oliveiras

Coorientador

LAVRAS-MG

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Chaves, Bruna Resende.

Effects of bovine serum albumin (BSA) and bicarbonate on the achievement of *in vitro* capacitation and subsequent progesterone-induced acrosome reaction in boar spermatozoa. / Bruna Resende Chaves. - 2019.

81 p.

Orientador(a): Márcio Gilberto Zangeronimo.

Coorientador(a): Marc Yeste Oliveiras.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Capacitação Espermática. 2. Espermatozoide. 3. Suíno. I. Zangeronimo, Márcio Gilberto. II. Oliveiras, Marc Yeste. III. Título.

BRUNA RESENDE CHAVES

**EFFECTS OF BOVINE SERUM ALBUMIN (BSA) AND BICARBONATE ON THE
ACHIEVEMENT OF IN VITRO CAPACITATION AND SUBSEQUENT
PROGESTERONE-INDUCED ACROSOME REACTION IN BOAR
SPERMATOZOA.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Fisiologia e Metabolismo, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 9 de julho de 2019.

Dra. Ana Paula Peconick	UFLA
Dr. Joan Enrique Rodriguez Gil	UAB - Universidad Autónoma de Barcelona - Espanha
Dr. Juliano Vogas Peixoto	UFLA
Dr. Marc Yeste de Oliveiras	UdG - Universidad de Girona - Espanha

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo
Orientador

Prof. Dr. Marc Yeste Oliveiras
Coorientador

**LAVRAS-MG
2019**

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela saúde, por ter guiado meus passos até aqui e por colocar pessoas maravilhosas iluminando o meu caminho.

Aos meus pais, pelo exemplo de vida. A vocês todo o meu amor e admiração.

Às minhas amadas irmãs pelo companherismo, carinho e sempre torcerem pelas minhas vitórias.

Ao Frederico por ser o meu melhor amigo e companheiro. Por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis, sempre me motivando a seguir em frente.

À minha amada família pelo afeto, torcida e orações.

Às minhas amadas Vó Inês (*in memoriam*) e Tia Dilude (*in memoriam*) por todo o amor e carinho.

A todas minhas amigas, em especial a Bárbara e Thaís, por terem feito parte dessa jornada. O apoio e carinho de vocês foram essenciais.

Ao meu orientador Márcio Zangeronimo, por ter acreditado em meu potencial desde a época da graduação e ter me dado oportunidade de integrar seu grupo de pesquisa no mestrado e doutorado. Muito obrigada por todos os ensinamentos.

Ao Marc Yeste, pelos preciosos ensinamentos, pela amizade, por me acolher tão bem em seu grupo de pesquisa e me proporcionar a oportunidade de realizar esse projeto de pesquisa no laboratório *Research Center of Biotechnology of Animal and Human Reproduction (Technosperm)* na Universitat de Girona, Girona - Espanha.

Ao Prof. Raimundo Vicente de Sousa (*in memoriam*) por ter sido um grande professor e amigo.

A todos integrantes do laboratório da *Technosperm*, principalmente Estela, Miriam e Ana Paula, pelos conhecimentos compartilhados e amizade.

Aos membros da banca por aceitarem gentilmente o convite de fazerem parte da minha trajetória acadêmica e, principalmente, por serem profissionais aos quais me espelho diariamente.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do Doutorado.

Aos professores, funcionários e colegas de pós-graduação em Ciências Veterinárias e Zootecnia, pelo excelente convívio, amizade, ensinamentos e troca de experiências.

À CAPES, pela bolsa de Doutorado e Doutorado Sanduiche, fundamentais à realização desse projeto de pesquisa.

A todas as pessoas que, de alguma forma, ajudaram na elaboração e desenvolvimento desse trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

“Onde não puder amar, não se demore.”

(Frida Kahlo)

RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos de diferentes concentrações de bicarbonato e albumina sérica bovina (BSA) adicionados ao meio de capacitação *in vitro* sobre a indução da reação acrossômica no sêmen suíno. Oito diferentes tratamentos com diferentes concentrações de bicarbonato (0, 5, 15 e 38 mM) e BSA (0 e 5 mg/ml) foram testados: 1) controle negativo (No BSA / No Bic), o meio básico sem bicarbonato ou BSA; 2) meio básico suplementado apenas com 5 mg / mL de BSA (BSA / No Bic); 3) meio básico suplementado com 5 mM de NaHCO₃ e 5 mg / mL de BSA (BSA + 5 mM Bic); 4) meio básico suplementado apenas com 5 mM de NaHCO₃ (sem BSA + 5 mM Bic); 5) meio básico suplementado com 5 mM de NaHCO₃ e 5 mg / mL de BSA (BSA + 15 mM Bic); 6) meio básico suplementado apenas com 15 mM de NaHCO₃ (sem BSA + 15 mM Bic); 7) meio básico suplementado com NaHCO₃ 38 mM e 5 mg / mL de BSA (BSA + Bic 38 mM); e 8) meio básico suplementado apenas com NaHCO₃ 38 mM (sem BSA + Bic 38 mM). As células espermáticas foram submetidas aos meios e incubadas a 38,5 °C com 5% de CO₂ por 5h. A motilidade espermática, integridade de membrana, distúrbio lipídico de membrana, níveis de cálcio intracelular, atividade mitocondrial e níveis de fosforilação de tirosina de GSK3 α e DARPP32 foram determinados após 0, 2 e 4 h de incubação e também após 30 e 60 min da adição de progesterona. Os meios sem BSA não se capacitaram, obtendo resultados semelhantes ao meio não capacitante (sem BSA e sem bicarbonato) (P<0,05). Os meios com BSA e bicarbonato a 15 ou 38 mM apresentaram (P<0,05) altos níveis de cálcio (Fluo-3 e Rhod 5), desordem lipídica (M540) e fosforilação de proteínas (GSK3 α). O meio com BSA e bicarbonato a 15 mM apresentou (P<0,05) maior motilidade e viabilidade que o meio com BSA e bicarbonato a 38 mM. O meio com BSA e sem bicarbonato ou com bicarbonato a 5 mM se capacitaram, porém com menores índices de capacitação que os meios que contiam BSA e bicarbonato a 15 ou 38 mM. Os resultados mostraram que a capacitação *in vitro* de sêmen suíno está relacionada com a presença de BSA no meio capacitante e a presença do bicarbonato não é um fator limitante para a capacitação. O meio que obteve melhor resultado de capacitação foi o BSA com bicarbonato a 15 mM.

Palavras-chave: Desordem lipídica. Suíno. Espermatozoide. Capacitação espermática.

ABSTRACT

The objective of the present work was to evaluate the effects of different concentrations of bicarbonate and bovine serum albumin (BSA), added to the in vitro capacitation medium, on the induction of the acrosome reaction in boar semen. Eight different treatments with different concentrations of bicarbonate (0, 5, 15 and 38 mM) and BSA (0 and 5 mg / ml) were tested: 1) negative control (No BSA / No Bic), which was the basic medium without bicarbonate or BSA; 2) basic medium supplemented with 5 mg/mL BSA only (BSA / No Bic); 3) basic medium supplemented with 5 mM NaHCO₃ and 5 mg/mL BSA (BSA + 5 mM Bic); 4) basic medium supplemented with 5 mM NaHCO₃ only (No BSA + 5 mM Bic); 5) basic medium supplemented with 5 mM NaHCO₃ and 5 mg/mL BSA (BSA + 15 mM Bic); 6) basic medium supplemented with 15 mM NaHCO₃ only (No BSA + 15 mM Bic); 7) basic medium supplemented with 38 mM NaHCO₃ and 5 mg/mL BSA (BSA + 38 mM Bic); and 8) basic medium supplemented with 38 mM NaHCO₃ only (No BSA + 38 mM Bic). Sperm cells were submitted to the medium and incubated at 38.5 °C with 5% of CO₂ for 5 h. Sperm motility, membrane integrity, membrane lipid disorder, intracellular calcium levels, mitochondrial activity and tyrosine phosphorylation levels of GSK3 α and DARPP32 were determined after 0, 2 and 4 h of incubation and after 30 and 60 min of the addition of progesterone. The medium without BSA did not capacitate, generating similar results to the non-capacitative medium (without BSA and without bicarbonate) ($P < 0.05$). Mediums with BSA and bicarbonate at 15 or 38 mM showed high ($P < 0.05$) levels of calcium (Fluo-3 and Rhod 5), lipid disorder (M540) and protein phosphorylation (GSK3 α). The medium with BSA and 15 mM bicarbonate presented ($P < 0.05$) greater motility and viability than the medium with BSA and bicarbonate at 38 mM. The medium with BSA and without bicarbonate or with 5 mM bicarbonate, were capacitated, however with lower indices than medium containing BSA and bicarbonate at 15 or 38 mM. The analyzes showed that the in vitro capacitation of boar semen is related to the presence of BSA in the capacitative medium and the presence of bicarbonate is not a limiting factor for the capacitation. The medium that obtained the best qualification result was BSA with bicarbonate at 15 mM.

Keywords: Membrane lipid disorder. Pig. Spermatozoa. Sperm capacitation.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1	A importância da capacitação espermática.....	12
2.2	Estruturas da célula espermática.....	13
2.3	Capacitação.....	15
2.4	Fatores relevantes para a capacitação espermática.....	28
2.4.1	Cálcio.....	28
2.4.2	Bicarbonato.....	22
2.4.3	Efluxo de colesterol e albumina sérica bovina (BSA).....	24
2.4.4	Fosforilação de proteínas.....	26
2.4.5	Parâmetros de motilidade.....	28
2.4.6	Reação acrossômica.....	30
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
	REFERÊNCIAS.....	35
	SEGUNDA PARTE.....	44
	ARTIGO CIENTÍFICO	44

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

A carne suína é a segunda mais produzida e a mais consumida no mundo (ABPA, 2018). Diante da importância econômica dessa atividade, os principais países produtores tem realizado muitas pesquisas para melhorar o desempenho reprodutivo. Entre as tecnologias mais utilizadas está a inseminação artificial que permitiu aumentar os rendimentos econômicos durante as três últimas décadas. Por outro lado, a fertilização *in vitro* (FIV) ainda não é uma técnica utilizada de maneira rotineira na espécie. A FIV permite o progresso genético pelo melhoramento do potencial dos gametas femininos, ou do melhor uso dos reprodutores; a produção de embriões de alto valor genético pela fecundação com espermatozoides sexados; e a redução do número de animais utilizados para experimentos.

O sucesso da FIV depende da capacitação espermática. Durante esse processo a célula é submetida a um conjunto de trocas funcionais que dão ao espermatozoide a capacidade de fecundar o oócito. Naturalmente, a capacitação espermática ocorre no oviduto. Já *in vitro*, esse processo pode ser induzindo com meios específicos. Nesse caso, o estudo da fisiologia funcional dos espermatozoides ganha importância especial com o propósito de aumentar a eficiência dos processos de capacitação *in vitro* de espermatozoides e, conseqüentemente, a fertilização.

As principais alterações fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante a capacitação espermática envolvem mudanças na permeabilidade e na composição lipídica da membrana, modulação intracelular da concentração de íons e fosforilação de proteínas intracelulares. No que tange aos conhecimentos atuais sobre capacitação *in vitro*, todos apontam que o meio capacitante deve conter íons cálcio, albumina sérica bovina (BSA) e bicarbonato (HCO_3^-) em concentrações adequadas. Porém, existem controvérsias importantes entre as pesquisas, principalmente quanto à concentração de HCO_3^- . Sabe-se que, *in vivo*, a capacitação espermática depende de uma dinâmica nas concentrações desse íon. Entretanto, *in vitro*, essa dinâmica é difícil uma vez que a concentração fixa de HCO_3^- ao meio capacitante resulta na capacitação de todas as células espermáticas ao mesmo tempo, aumentando, com isso a taxa de polispermia. Além disso, não está bem definido quais seriam as concentrações ideais dessa substância aos meios de capacitação para

suínos. Nesse caso, estudos são necessários, considerando diferentes condições de maturação.

Outro fator importante é que, rotineiramente, os trabalhos com capacitação espermática *in vitro* de suínos utiliza a BSA no meio capacitante. Porém, há pouca informação sobre a importância dessa substância para o processo de capacitação, considerando diferentes concentrações de HCO_3^- . Diante do exposto, as hipóteses levantadas previamente à pesquisa foram que a adição de HCO_3^- e BSA ao meio de capacitação seja essencial para realização da capacitação no espermatozoide suíno. Sendo assim, objetivou-se avaliar a suplementação do meio de capacitação *in vitro* com diferentes concentrações de bicarbonato (0,5, 15 e 38 mM) e BSA (0 e 5 mg/ml) sobre a capacitação espermática de suínos *in vitro*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A importância da capacitação espermática

O espermatozoide é capaz de fertilizar um oócito somente após várias alterações bioquímicas no genital feminino. Tais alterações são denominadas capacitação. O espermatozoide capacitado, interage com a zona pelúcida (ZP) do oócito e sofre a reação acrossômica, que permite sua penetração no oócito e a fertilização (YESTE et al., 2013; BUFFONE et al., 2014; GERVASI; VISCONTI, 2016). Esse processo fisiológico foi descoberto em 1951 em observações independentes em ratos (AUSTIN, 1951) e coelhos CHANG (1951). A partir de então, soube-se que os espermatozoides devem permanecer no genital feminino por um período de tempo, de aproximadamente 2 a 6 h no caso de suínos, antes de ganhar capacidade fertilizante (SIGNORELLI; DIAZ; MORALES, 2012).

O processo de capacitação ocorre dentro do oviduto em três momentos: durante a liberação do reservatório de espermatozoides, durante a remodelação da superfície do acrossoma e durante a preparação das membranas espermáticas para a fusão com oócito (GERVASI; VISCONTI, 2016). Entre as alterações bioquímicas da capacitação estão o efluxo de colesterol da membrana plasmática, levando ao aumento da fluidez da membrana, da permeabilidade aos íons de bicarbonato e cálcio, hiperpolarização da membrana plasmática, alterações na atividade de fosforilação de proteínas e ativação de proteína quinase A. Gerando o aumento no pH, na concentração de HCO_3^- , Ca^{2+} e

monofosfato cíclico de adenosina monofosfato (CAMPAGNA et al. 2009) na célula espermática. A capacitação espermática em mamíferos pode ser simulada *in vitro* por incubação de espermatozoides em meio de cultura padrão contendo Ca^{2+} , HCO_3^- , fontes de energia e um receptor de colesterol, geralmente BSA (STIVAL et al., 2016; STIVAL et al., 2018).

O interesse científico pela reprodução suína tem passado por significativos avanços nas técnicas de ciência básica e reprodução assistida. Particular ênfase tem sido dada ao desenvolvimento de diferentes protocolos para fertilização *in vitro* e produção *in vitro* de embriões viáveis em suínos. Para tanto, foram realizados inúmeros estudos relacionados à sinalização do processo de capacitação espermática, às moléculas envolvidas na interação e na fertilização dos gametas e no desenvolvimento embrionário precoce, *in vivo* e *in vitro* (ROMAR; FUNAHASHI; COY, 2016). Embora essas técnicas tenham conseguido boa eficiência em algumas espécies de mamíferos, tal como bovinos, os resultados obtidos em suínos não são até agora, comparáveis com a produção *in vivo*. O estudo da fisiologia e funcionalidade dos espermatozoides, desde sua origem no testículo até o local da fertilização, e do oócito e sua interação com os espermatozoides, ganha importância especial no propósito de aumentar a eficiência dos processos de capacitação *in vitro* de espermatozoides e fertilização.

2.2 Estruturas da célula espermática

A estrutura geral dos espermatozoides está ligada à sua função básica de alcançar e fecundar o oócito. São células haplóides, pequenas, alongadas, constituídas de cabeça, peça intermediária e cauda. Possuem também uma membrana plasmática circundante (FLESCHE; GADELLA, 2000).

A cabeça consiste em um núcleo, o acrossoma e pequenas quantidades de estruturas do citoesqueleto e citoplasma. A sua principal função é liberar o material genético contido em seu núcleo para o oócito (FLESCHE; GADELLA, 2000). O espermatozoide possui um núcleo altamente condensado e transcricionalmente silencioso. Sua atividade de translação também é insignificante (MILLER; OSTERMEIER, 2006). Sendo assim, a função espermática é dependente de processos pós-traducionais (CORREIA; MICHELANGELI; PUBLICOVER, 2015).

O acrossoma é uma grande vesícula secretora e está ligado à membrana situada na parte anterior da cabeça e se espalha recobrendo o núcleo. O acrossoma contém a

camada hidrolítica de enzimas, as quais são necessárias para a penetração de espermatozoides na zona pelúcida do oócito durante o processo de reação acrossômica (MORENO; ALVARADO, 2006). O acrossoma deve se manter intacto antes e durante o trajeto do espermatozoide até a sua ligação com a zona pelúcida na ampola. Caso ocorra uma reação acrossomal precoce, ocorre a infertilidade espermática (SILVA; GADELLA, 2006).

As membranas (plasmática, nuclear, acrossomal e mitocondrial) são formadas por lipídios, proteínas, glicoproteínas, colesterol e glicolipídios. Essas membranas circundam toda a célula espermática, mantendo suas organelas e componentes intracelulares juntos. Por meio das características semipermeáveis dessas membranas, mantém-se um gradiente químico de íons e outros componentes solúveis. Assim, as membranas desempenham um papel significativo na fertilidade, na reação acrossômica e na aquisição de motilidade dos espermatozoides (GADELLA; BOERKE, 2016).

A membrana plasmática possui uma alta proporção de fosfolipídios poli-insaturados, colesterol e proteínas organizados em domínios discretos na cabeça e cauda do espermatozoide (GADELLA et al., 2008). Essas biomoléculas não são organizadas aleatoriamente, mas mantidas em uma assimetria de moléculas específicas, o que é necessário para o bom funcionamento dos espermatozoides. A membrana passa por modificações durante o trânsito e armazenamento no epidídimo e genital feminino (GADELLA; HARRISON, 2000).

Durante esse tempo, a fluidez da membrana plasmática varia até alcançar os oócitos. Tal variação é essencial para a maturação e fertilização espermática até a fecundação (KAWANO et al., 2011). Esse processo envolve não só o reposicionamento de componentes proteicos e lipídicos da membrana, mas também a modulação de enzimas para a realização da capacitação, reação acrossômica e ligação ao oócito (GADELLA; BOERKE, 2016).

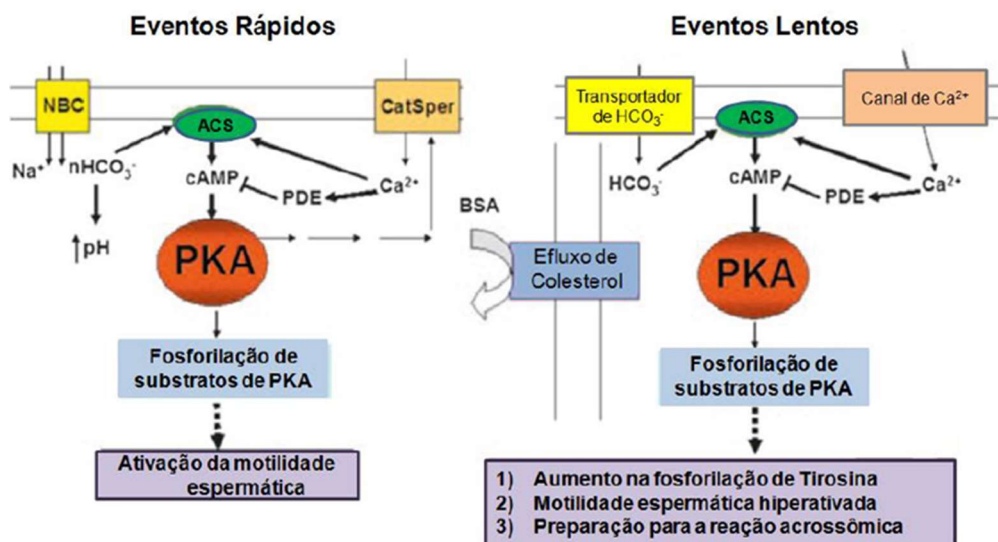
A principal função da cauda do espermatozoide é o deslocamento da célula pelo genital feminino até a penetração na ZP do oócito (MORTIMER, 1997). Na peça intermediária estão localizadas mitocôndrias, que podem gerar ATP por metabolismo aeróbico e está diretamente ligada com a motilidade do espermatozoide. Essas propriedades específicas do flagelo e o estado de fosforilação de proteínas dentro da célula espermática são responsáveis por determinar os padrões de motilidade e hipermotilidade na capacitação (GADELLA; FERRAZ, 2015).

Os espermatozoides maduros são células altamente especializadas, porém, incapazes de transcrição ou tradução. Modificações pós-traducionais através de proteínas fosforilação/ desfosforilação mediada por quinases e fosfatases são de grande importância na regulação de diferentes processos celulares, incluindo motilidade espermática, reconhecimento da zona pelúcida, reação acrossômica e capacitação (ASQUITH et al., 2004; NAZ; RAJESH, 2004).

2.3 Capacitação espermática

Uma vez ejaculado, o espermatozoide encontra primeiro o fluido seminal e mais tarde outros fluidos secretados pelo epitélio do genital feminino. O oviduto *in vivo* fornece um ambiente adequado para transporte, armazenamento e capacitação de espermatozoides; para coleta de transporte e maturação de oócitos; e para fertilização e desenvolvimento embrionário inicial (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007). Nesse ambiente, o bicarbonato, o cálcio e um ligante de colesterol, como a BSA, são essenciais para o processo de capacitação. Essas substâncias induzem modificações lipídicas na membrana, perda de colesterol, ativação da via AMPc / PKA e aumento da captação de Ca^{2+} e do pH intracelular (AITKEN; NIXON, 2013). A cascata de eventos que ocorre durante o processo de capacitação pode ser dividida em eventos lentos e rápidos conforme a Figura 1 (VISCONTI, 2009).

Figura 1- Bases moleculares de eventos rápidos e lentos associados à capacitação espermática. Nos eventos rápidos, o HCO_3^- e o Ca^{2+} estimulam a ativação da motilidade espermática, através da adenil ciclase solúvel (ACS) e proteína quinase A (PKA). Esses íons são transportados por um cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) e um canal de cálcio específico espermático (CatSper). Nos eventos lentos, o espermatozoide adquire a habilidade para fertilizar o ovócito, havendo o aumento na fosforilação de tirosina, presença da motilidade espermática hiperativada e preparação para a ocorrência da exocitose do acrossoma. cAMP = adenosina monofosfato cíclico; PDE = fosfodiesterases; BSA = albumina sérica bovina representando uma proteína removedora de colesterol.



Fonte: Adaptado de Visconti (2009)

Os principais eventos de capacitação incluem: (I) desestabilização da membrana espermática com a eliminação ou alteração de moléculas, modificando sua fluidez; (II) aumento do influxo de cálcio para o interior da célula, como consequência da desestabilização da membrana; (III) ativação do movimento hiperativo que permite aos espermatozoides passar por todo o fluido do oviduto e; (IV) ativação das vias do segundo mensageiro (YANAGIMACHI, 1994; SUAREZ, 2008; VISCONTI, 2009). A modificação inicial da membrana é responsável pela cascata de eventos de fosforilação resultando no aumento da fosforilação da tirosina das proteínas espermáticas, que é um evento característico de capacitação (NEWTON et al., 2009; JAGAN MOHANARAO; ATREJA, 2011).

Durante a capacitação, as proteínas podem ser fosforiladas em resíduos de serina, treonina e/ou tirosina (YESTE et al., 2013). Assim, observa-se uma relação direta entre as proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina, treonina e serina e a capacitação

espermática em diferentes espécies de mamíferos, como suínos (BRAVO et al., 2005). Desse modo, tem sido relatado que em mamíferos, a inibição da fosforilação da PKA impede a capacitação espermática, reação acrossômica e fertilização *in vitro* e pode ser causa de infertilidade (SIGNORELLI; DIAZ; MORALES, 2012; NARESH; ATREJA, 2015).

Como citado anteriormente, a capacitação pode ser realizada *in vitro*. Existem diferentes meios de capacitação que realizam a capacitação espermática em mamíferos e esses meios devem conter fontes de energia (piruvato, lactato e glicose), BSA, cálcio e bicarbonato de sódio. (GADELLA; BOERKE, 2016). A BSA serve como um receptor para a remoção do colesterol da membrana plasmática. Esse evento é responsável pelas mudanças na fluidez da membrana durante a capacitação (NAZ; RAJESH, 2004). Além disso, o papel do cálcio e do bicarbonato na capacitação espermática é de grande importância. Foi observado que ambos estão envolvidos no aumento do AMPc observado durante a capacitação, desencadeando todos os eventos que levam a um aumento da fosforilação de proteína, movimento hiperativo e reação acrossômica (YESTE et al., 2015). Entretanto, os requisitos iônicos para a capacitação espermática são específicos da espécie. Em suínos, a presença de cálcio extracelular no meio capacitante é um pré-requisito para o aumento dos níveis intracelulares de cálcio e a fosforilação da tirosina que ocorrem durante a capacitação e reação acrossômica da célula espermática (DUBE et al., 2005).

O bicarbonato tem sido considerado um fator chave na promoção da capacitação *in vitro*. *In vivo*, foi observado que existem diferentes níveis de bicarbonato extracelular ao longo do genital de machos e fêmeas, sendo que a maior concentração ocorre durante o momento da ovulação. Isso pode sugerir que o bicarbonato desempenha um papel na supressão ou na promoção da capacitação espermática (YESTE et al., 2013). De fato, o bicarbonato também está envolvido no remodelamento da arquitetura da membrana plasmática, no aumento da motilidade dos espermatozoides e na migração de seminolípidios da região apical da cabeça para domínio equatorial durante a capacitação (VISCANTI; KOPF, 1998; YESTE et al., 2013). Os seminolípidios estabilizam a membrana plasmática e protegem os espermatozoides de uma reação acrossômica antecipada quando os níveis de bicarbonato são ainda baixos. No entanto, quando os níveis de bicarbonato são aumentados, eles são translocados para a região equatorial, então seu papel protetor diminui (GADELLA; BOERKE, 2016).

2.4 Fatores relevantes para a capacitação espermática

Atualmente, o trajeto do espermatozoide até o oócito e a fertilização *in vivo* ainda são pouco compreendidas. O que parece claro é que todos os processos e eventos físico-químicos que o espermatozoide passa desde sua origem nos testículos até o local de fertilização são um sistema coordenado em que cada etapa é importante para o sucesso da disseminação genética.

2.4.1 Cálcio

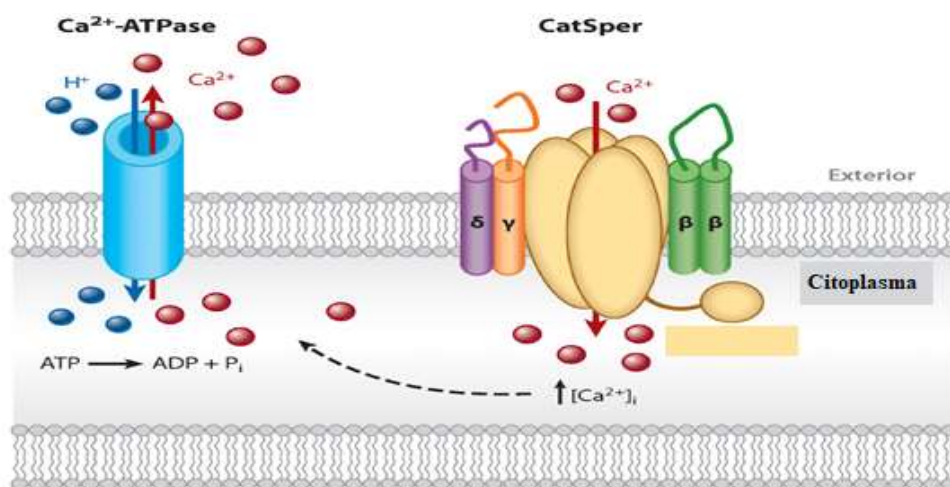
Em todos os tipos de células, o cálcio desempenha papel essencial como segundo mensageiro controlando uma bateria de processos celulares. Em suínos, o cálcio é um dos fatores chave para modificações pós-traducionais desempenhando um papel central no processo de capacitação (TARDIF; DUBÉ; BAILEY, 2003). Na célula espermática o acrossoma e a peça intermediária são locais de armazenamento do cálcio intracelular (CORREIA; MICHELANGELI; PUBLICOVER, 2015; YESTE et al., 2015). Alguns estudos sugerem que o fato de o cálcio ser armazenado em locais separados, pode exercer funções diferentes. Assim, o cálcio armazenado na cabeça poderia estar envolvido na modulação da reação acrossômica induzida pela progesterona, já o cálcio localizado na peça intermediária poderia estar mais intimamente ligado com processos modulados pela mitocôndria, como a motilidade espermática, produção de energia baseada em mitocôndrias e etapas iniciais da capacitação (COSTELLO et al., 2009).

Durante a capacitação em mamíferos ocorre um influxo de cálcio a partir do meio extracelular que modula diferentes vias enzimáticas e metabólicas. Esse influxo é uma das consequências mais importantes da retirada de colesterol das membranas, sendo considerado um pré-requisito para o processo de hiperativação e reação acrossômica (GADELLA; BOERKE, 2016). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos no controle de cálcio bem como a identidade dos seus alvos (NAVARRETE et al., 2015). Os espermatozoides apresentam ampla gama de canais de cálcio dependentes de voltagem e sem voltagem, como CatSper (canais de cátion espermáticos) e CCDV (canais de cálcio dependente de voltagem). Esses dois sistemas de transporte de cálcio foram identificados conclusivamente no espermatozoide e são conhecidos por estarem

envolvidos na regulação da motilidade, capacitação e reação acrossômica induzida pela progesterona (LISHKO et al., 2012; RAHMAN; KWON; PANG, 2014; CORREIA; MICHELANGELI; PUBLICOVER, 2015).

O canal de cálcio Catsper é um complexo de pelo menos 7 subunidades (CatSper 1, 2, 3, 4, β , γ e δ) localizadas na membrana plasmática do espermatozoide. Esse sistema representa o principal canal de cálcio nas células espermáticas (Figura 2). Esse canal é fracamente sensível à voltagem e é ativado pela alcalinização intracelular. O canal também é sensível a progesterona (LISHKO; BOTCHKINA; KIRICHOK, 2011). *In vivo*, a progesterona contida no fluido folicular pode, portanto, causar forte ativação do canal à medida que o espermatozoide se aproxima do oócito, aumentando assim o nível de cálcio e as atividades reguladoras de influxo necessárias para a fertilização (LISHKO et al., 2012; BROWN et al., 2017).

Figura 2- Estrutura do canal CatSper. Este canal é ativado pelo aumento do pH intracelular. O Ca^{2+} fornecido através do CatSper é bombeado por um Ca^{2+} ATPase flagelar que exporta o íon de Ca^{2+} citoplasmático e importa os prótons extracelulares.



Fonte: Adaptado de Lishko (2011)

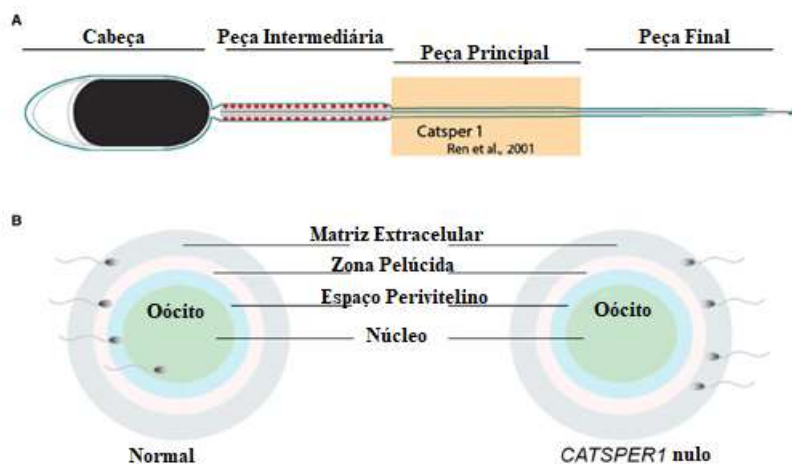
Em suínos, o canal CatSper regula a motilidade dos espermatozoides durante eventos relacionados à capacitação *in vitro* (VICENTE-CARRILLO; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2017). Nessa mesma espécie, a expressão de CatSper 2 e 4 foram confirmadas em testículo enquanto a expressão de CatSper1 foi detectada em testículo e no hipotálamo. Já a CatSper3 foi observada sua expressão distribuída nos órgãos nervosos (cérebro, cerebelo, hipófise, hipotálamo, hipocampo) e genital masculino (testículos, epidídimo, próstata e vesícula seminal) (SONG et al.,

2011). As subunidades CatSper1 e CatSper2 em camundongos foram identificadas como essencial para a motilidade dos espermatozoides e fertilidade (CARLSON et al., 2005). Verificou-se também que o CatSper1 é necessário para a ativação da corrente de cálcio responsável pela alcalinização durante a capacitação das células espermáticas (KIRICHOK; NAVARRO; CLAPHAM, 2006); enquanto CatSper3 e CatSper4 são essenciais para a motilidade hiperativada espermática e fertilidade (QI et al., 2007). Além disso, o influxo de cálcio durante a capacitação *in vitro* induzida pela BSA ocorre devido a atividade do canal CatSper, sendo essencial para hiperativação e fertilização (XIA; REN, 2009).

Ratos nocautes para CatSper1, 2, 3 e 4 resultam na falta de funcionalidade CatSper dando origem a um fenótipo estéril e ausência das demais subunidades (CARLSON et al., 2005; QI et al., 2007; CHUNG et al., 2011). Em humanos, as mutações em genes CatSper são associadas à infertilidade, indicando que o CatSper representa um fator de sinalização central no espermatozoide humano, integrando diversas sinalizações que auxiliam a capacitação e conseqüentemente a fertilização (SMITH et al., 2013; JAISWAL et al., 2014). A disfunção de CatSper sem resposta ao cálcio intracelular ou à progesterona é suficiente para comprometer a capacidade de fertilização (WILLIAMS et al., 2015).

Células espermáticas negativas para CatSper aderem ao oócito, porém, são incapazes de penetrar na zona pelúcida. Provavelmente isso ocorre devido à falta de motilidade hiperativada (LISHKO et al., 2012). *In vivo*, o espermatozoide penetra na zona pelúcida para se fundir com a membrana plasmática do oócito. *In vitro*, quando as camadas externas do oócito foram enzimaticamente removidas, mesmo na ausência de CatSper, os espermatozoides realizaram penetração e fertilização (SINGH; RAJENDER, 2015). Desse modo, o CatSper facilita a penetração do espermatozoide pelas camadas externas do oócito (Figura 3) (AVENARIUS et al., 2009).

Figura 3- O Papel do CatSper1 na Capacitação e Fertilização. (A) expressão CatSper1 na cauda do espermatozoide do rato. (B) os espermatozoides nulos CatSper1 não conseguem penetrar na zona pelúcida para fertilizar o oócito.



Fonte: Adaptado de Avenarius et al. (2009)

O segundo tipo de canal iônico é o canal de cálcio dependente de voltagem (CCDV). Em mamíferos foram identificados três subtipos (CCDV1, 2 e 3), todos localizados na membrana externa mitocondrial, onde regulam diversos processos biológicos (NAVARRETE et al., 2015). Embora o CCDV tenha sido extensivamente estudado em vários tecidos e células, há pouco conhecimento sobre a distribuição e função da CCDV no sistema reprodutor masculino de mamíferos (LIU; WANG; CHEN, 2012). É sabido que esses canais desempenham papel importante durante a capacitação espermática, permitindo o transporte através de membranas plasmáticas e mitocondriais de moléculas específicas, essenciais para a obtenção das funções espermáticas durante a capacitação e fertilização (KWON et al., 2013). Além disso, sua atividade é altamente sensível a qualquer mudança no pH intracelular durante a capacitação (NERI-VIDAURRI PDEL; TORRES-FLORES; GONZALEZ-MARTINEZ, 2006).

O canal CCDV2 está presente nas células espermáticas de suínos e é conhecido por estar envolvido no transporte de cálcio em células somáticas. Quando ocorre o bloqueio desse canal, a capacitação espermática é influenciada (MARTINEZ-ABAD et al., 2017). Esse canal promove o transporte de Ca^{2+} para as mitocôndrias, conhecidas por serem um dos locais de armazenamento de Ca^{2+} na célula espermática de mamíferos (YESTE et al., 2015). O CCDV2 também foi localizado no exterior da membrana mitocondrial e do acrossoma de espermatozoides de mamífero (VILAGRAN et al., 2014). Além disso, em camundongos, a reação acrossômica depende da entrada de Ca^{2+} nos

espermatozoides e essa, é mediada principalmente via CCDVs, que são ativados por hiperpolarização da membrana durante a capacitação (DE LA VEGA-BELTRAN et al., 2012).

É necessária uma quantidade suficiente de cálcio extracelular para a capacitação espermática. Ao sair do epidídimo, os espermatozoides entram em contato com o fluido seminal, o qual contém alto teor de bicarbonato e cálcio. Esses íons estão relacionados à ativação do AMPc (CARLSON et al., 2005). Esse influxo de cálcio intracelular ativa o adenilato ciclase que, por sua vez, aumenta os níveis de AMPc e, assim, gera uma motilidade ativada (VADNAIS; GALANTINO-HOMER; ALTHOUSE, 2007; VISCONTI, 2009). A hiperativação da motilidade, caracterizada por movimentos vigorosos e não progressivos, ocasionados por batimentos flagelares assimétricos de alta amplitude, fornece uma condução de força para os espermatozoides nadarem em ambientes de viscosidade aumentada como o oviduto e a zona pelúcida (SUAREZ, 2008).

Em suínos, o bicarbonato e o cálcio agem de forma sinérgica para capacitação, sendo que o primeiro estimula a entrada do segundo no interior da célula (HARRISON; GADELLA, 2005). Além disso, como descrito anteriormente, *in vitro* a BSA também é necessária para a entrada de cálcio na célula espermática (ESPINOSA et al., 2000). Em camundongos, o espermatozoide foi capaz de fecundar *in vitro* sem a ativação de vias de fosforilação dependentes de AMPc pelo bicarbonato, se capacitando apenas pelo cálcio ionóforo A23187 (TATENO et al., 2013).

Outro aspecto que influencia a capacitação relacionada ao cálcio é o pH. O espermatozoide não capacitado mantém um pH mais ácido, atuando com um regulador do influxo de cálcio, prevenindo assim a capacitação e a reação acrossomal antecipada (NERI-VIDAURRI PDEL; TORRES-FLORES; GONZALEZ-MARTINEZ, 2006).

2.4.2 Bicarbonato (HCO_3^-)

O HCO_3^- é conhecido pelo seu efeito ativador no espermatozoide de mamíferos. Em geral esse mecanismo ocorre pela ativação da adenilil ciclase flagelar (OKAMURA et al., 1985). Em suínos, os espermatozoides imóveis da cauda do epidídimo, cujo pH é próximo de 6,5, são ativados em aproximadamente 5 minutos quando expostos ao HCO_3^- do plasma seminal (TAJIMA; OKAMURA; SUGITA, 1987). A ativação da motilidade espermática acompanha a ejaculação devido à interação com o plasma seminal (LIU; WANG; CHEN, 2012). É importante enfatizar que a função do HCO_3^- não se restringe

somente à ativação da motilidade dos espermatozoides, mas também em muitos processos reprodutivos, incluindo a capacitação (HARAYAMA, 2013; BUFFONE et al., 2014; GANGWAR; ATREJA, 2015; SORIANO-UBEDA et al., 2019).

O HCO_3^- foi identificado como um agente chave para a capacitação. O influxo dessa substância na célula espermática durante a capacitação aumenta o pH intracelular e aumenta os níveis de AMPc, culminando com as alterações na arquitetura dos lipídios e hiperpolarização da membrana plasmática e aumento da motilidade (ZHOU et al., 2015). O HCO_3^- é transportado em maior quantidade para o citoplasma do espermatozoide quando essa célula é exposta a concentrações mais elevadas desse íon no genital feminino (GANGWAR; ATREJA, 2015).

O transporte de HCO_3^- nos espermatozoides ocorre através da membrana plasmática pelas ações da anidrase carbônica, co-transportador de bicarbonato de sódio e trocador de bicarbonato-cloreto (HARAYAMA, 2013). Assim, o aumento no pH intracelular estimula a atividade da adenilato ciclase solúvel, um tipo único de adenilato ciclase presente no espermatozoide. A principal característica dessa enzima é que ela é ativada tanto por HCO_3^- quanto pelo Ca^{2+} e não pela proteína G, como a maioria das adenilato ciclases transmembrana (HARRISON; GADELLA, 2005). Isso ocorre porque o aumento das concentrações intracelulares de HCO_3^- produz uma assimetria da membrana plasmática, ativando as enzimas que translocam os fosfolipídeos de membrana, tais como a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina (GADELLA, ; HARRISON, 2000). Esse evento facilita a remoção do colesterol da membrana espermática pelas proteínas, como a albumina e as lipoproteínas de alta densidade (VISCANTI, 2009). Assim, o aumento do pH intracelular decorrente do influxo de HCO_3^- resulta na ativação da SACY e aumento da concentração de AMPc no citosol (GANGWAR; ATREJA, 2015). Ao mesmo tempo, o aumento intracelular de AMPc desencadeia a ativação da PKA e das tirosinas quinases e, desse modo, as vias de sinalização da capacitação (VISCANTI; KOPF, 1998; WENNEMUTH, 2003).

A diferença na concentração *in vivo* de HCO_3^- no fluido do epidídimo para o plasma seminal e fluido do oviduto desempenha um papel importante na supressão de capacitação no epidídimo e na promoção desse processo no genital feminino (RODRIGUEZ-MARTINEZ; EKSTEDT; EINARSSON, 1990; SORIANO-UBEDA et al., 2019). A capacitação espermática no istmo é iniciada sob uma concentração de HCO_3^- ao redor de 10 mM e os espermatozoides são progressivamente expostos ao HCO_3^- à medida que se locomovem para o local de fertilização. Os níveis de HCO_3^- no útero e

oviduto são maiores que 20 mM (RODRIGUEZ-MARTINEZ; EKSTEDT; EINARSSON, 1990). *In vitro* não existe essa dinâmica na concentração de bicarbonato, pelo contrário, os meios de capacitação e fertilização *in vitro* de suínos geralmente contém uma concentração padrão de 25 mM. Um dos principais problemas apresentados, nesse caso, é a alta incidência de polispermia (SORIANO-UBEDA et al., 2019).

A secreção defeituosa de HCO_3^- pelo útero pode comprometer a capacitação espermática e, conseqüentemente, a fertilidade feminina (WANG et al., 2003). FLESCHE; GADELLA (2000) sugeriram que a ausência de HCO_3^- provavelmente impediu certos eventos de capacitação, resultando em menor afinidade na ligação dos espermatozoides com a ZP. Corroborando esses resultados, o processo de fertilização realizado por Soriano-Úbeda et al. (2019) teve como resultado nenhum oócito penetrado na ausência de HCO_3^- no meio fertilizante.

Por outro lado, experimentos realizados com suínos alcançaram a capacitação espermática em um meio sem bicarbonato, incluindo apenas BSA como fator de capacitação (RAMIO-LLUCH et al., 2011; RAMIO-LLUCH et al., 2012b; RAMIO-LLUCH et al., 2012a; RAMIO-LLUCH et al., 2014; ROMAROWSKI et al., 2015). Assim, há indícios que, embora o bicarbonato seja um fator importante para a capacitação de espermatozoides, em suínos, esse não é um requisito absoluto para atingir a capacitação *in vitro*. Nesse caso, existe a hipótese da BSA poder atuar como o único fator capacitante.

2.4.3 Albumina sérica bovina (BSA) e o efluxo de colesterol

O colesterol é um componente essencial da membrana plasmática dos mamíferos, porque promove a estabilidade da membrana. No entanto, durante o processo de capacitação, ocorre a remoção do colesterol da membrana espermática, culminando com a redução na relação colesterol/fosfolipídio e aumento da fluidez de membrana (GADELLA, B. M.; FERRAZ, 2015). De maneira geral, o colesterol está mais concentrado em regiões altamente organizadas da membrana plasmática do espermatozoide, mais especificamente, na região acrossomal, sob a forma de microdomínios conhecidos como balsas lipídicas (SELVARAJ et al., 2009).

A relação colesterol/fosfolipídio no espermatozoide varia entre as espécies. Existe uma correlação entre essa relação no espermatozoide e o tempo necessário para completar a capacitação. Ao comparar diferentes espécies de mamíferos quanto maior a relação

colesterol/fosfolípido, maior o período de incubação para a capacitação a ser alcançada (OSTERMEIER et al., 2018). Em espécies cujas células possuem membrana rica em colesterol, como humanos e bovinos, os eventos de capacitação não são evidenciados na mesma velocidade como nas espécies com pouco colesterol na membrana como suínos e ovinos. Devido a isso, o tempo para capacitação varia em decorrência da necessidade de maior tempo para as espécies com alto nível de colesterol (FLESCH; GADELLA, 2000).

As proteínas como a albumina e as lipoproteínas de alta densidade são responsáveis pelo efluxo de colesterol da membrana espermática (VISCONTI, 2009), e o processo é facilitado pelo aumento das concentrações intracelulares de HCO_3^- , o qual produz uma assimetria da membrana plasmática, ativando as enzimas que translocam os fosfolípidos de membrana, tais como a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina (GADELLA, B.; HARRISON, 2000). *In vivo*, evidências apontam a presença de albumina e HDL, no fluido folicular e ovidutal (VISCONTI et al., 1999), no entanto o HDL é o principal responsável pelo efluxo de colesterol e ativação das vias de transdução de sinal ligadas à capacitação no genital feminino. Nos meios de capacitação *in vitro*, o HDL pode ser efetivamente substituído no meio de capacitação por BSA (LEAHY; GADELLA, 2015; SALMON; LECLERC; BAILEY, 2016).

A albumina é o aceitador de colesterol mais utilizado em experimentos *in vitro* (LEAHY; GADELLA, 2015). Assim, a BSA inserida quimicamente nos meios de capacitação *in vitro* realiza a extração de colesterol da membrana plasmática do espermatozoide, levando a um deslocamento dos fosfolípidos e um novo rearranjo da sua estrutura aumentando a fluidez da membrana (FLESCH; GADELLA, 2000; BOERKE et al., 2014). A diminuição do colesterol provoca aumento do distúrbio entre os fosfolípidos da membrana, que inicia uma cadeia de eventos como aumento do pH intracelular, cálcio e bicarbonato, ativação da adenilato ciclase e do AMPc e fosforilação de proteínas específicas (BAILEY, 2010). Todos esses eventos são sincronizados com a ocorrência de ovulação (HUNTER; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2004) e essa remodelação da membrana que permite acoplamento acrossoma e / ou formação de o complexo proteico de reconhecimento da zona pelúcida (BOERKE et al., 2014).

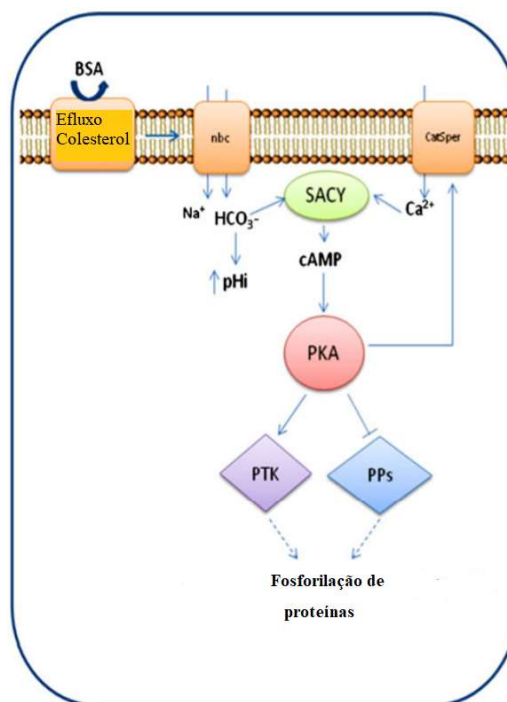
2.4.4 Fosforilação de proteínas

A fosforilação das proteínas de membrana juntamente com a fosforilação dos resíduos de tirosina das proteínas espermáticas em espermatozoides de mamíferos é a via central de ativação da capacitação espermática (VISCONTI et al., 1998), ocorrendo em

várias regiões da célula. A fosforilação de proteínas flagelares está relacionada com a aquisição da hipermotilidade (PETRUNKINA et al., 2003), ao passo que a fosforilação na região acrossomal com a interação do espermatozoide com a zona pelúcida e a penetração do oócito (DUBE et al., 2005). Na zona espermática equatorial, a fosforilação proteica da tirosina influencia na fusão dos gametas (JONES et al., 2008).

A capacitação espermática envolve mudanças que são desencadeados por diferentes estímulos extracelulares, tais como HCO_3^- e Ca^{2+} , como descrito anteriormente, os quais geram a ativação intracelular SACY e AMPc / PKA, levando à estimulação da fosforilação da proteína tirosina (Figura 4) (SIGNORELLI; DIAZ; MORALES, 2012).

Figura 4 – O efluxo de colesterol da membrana espermática, juntamente com altos níveis de Ca^{2+} (cálcio) e HCO_3^- (bicarbonato) os quais ativam SACY (adenil ciclase solúvel) que, por sua vez ativa PKA (proteína quinase A). Esse mecanismo, através da ativação de tirosina quinases (PTK) ou da inibição da fosfatases (PPs), permite o aumento na fosforilação de proteínas intracelulares. AMPc= (3'5' adenosina-monofosfato-cíclico); BSA = albumina sérica bovina representando uma proteína removedora de colesterol; CatSper= canal de cálcio; nbc = cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$.



Fonte: Adaptado de Signorelli (2012)

A fosforilação de proteínas é um evento de modificação pós translacional que atua como um dos mecanismos reguladores chave da célula para controlar os vários processos fisiológicos (ASQUITH et al., 2004). Gangwar e Atreja (2015) afirmaram que os processos celulares como a capacitação, hiperativação, reação acrossômica, motilidade,

ligação com a zona pelúcida e fusão das membranas são regulados pela fosforilação dos resíduos de tirosina espermáticos.

O aumento gradual na fosforilação de tirosina é um marco da progressão da capacitação (VISCONTI et al., 1998), sendo que esse processo é regulado por via da proteína-quinase dependente de AMPc envolvendo a PKA (NAZ; RAJESH, 2004). No espermatozoide, o AMPc ativa a PKA, a qual aumenta a fosforilação das proteínas espermáticas (GANGWAR; ATREJA, 2015). Com ativação da PKA, a capacitação induz a fosforilação das proteínas da membrana plasmática, as quais estão envolvidas na ligação espermática à zona pelúcida e na reação acrossômica (SIGNORELLI et al. 2012).

As quinases e fosfatases participam das vias moleculares que regulam, entre outros eventos celulares, a motilidade e capacitação espermática (LACKEY; GRAY, 2015). Uma quinase crucial em espermatozoides é glicogênio sintase quinase-3 (GSK3), presente em duas isoformas (GSK3 α e GSK3 β), as quais compartilham 97% de similaridade de sequência em tecidos de mamíferos (BEUREL; GRIECO; JOPE, 2015). Sabe-se que essa proteína está relacionada com a motilidade espermática (APARICIO et al., 2007; BRAGADO et al., 2010; GONG et al., 2017), capacitação espermática, reação acrossômica (REID et al., 2015) e capacidade de fertilização (BELENKY; BREITBART, 2017).

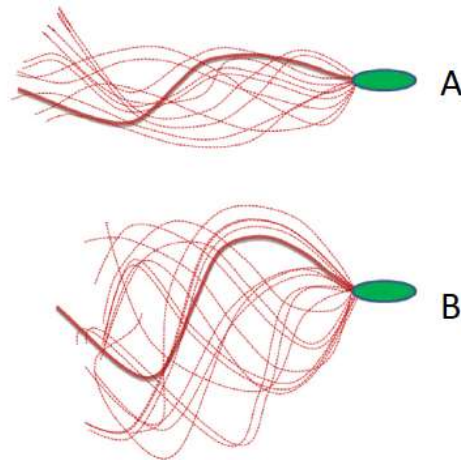
Em resposta a estímulos que induzem ativação da via AMPc / PKA em espermatozoides de suínos, tanto a GSK3 α quanto a GSK3 β são claramente fosforiladas em Ser21 e Ser9, respectivamente (APARICIO et al., 2007; BRAGADO et al., 2010). Assim, o modelo de sinalização GSK3 em espermatozoides de suínos inicia com a ativação da SACY que aumenta os níveis de AMPc e, subsequentemente, ativa PKA, que leva a fosforilação direta de GSK3 α em Ser21 (FANG et al., 2000). Estudos com o objetivo de elucidar o papel funcional da fosforilação GSK3 na motilidade espermática relataram uma correlação positiva entre a inativação da GSK3 e aumentos na velocidade curvilínea, velocidade linear reta e, posteriormente, na porcentagem de espermatozoides velocidade progressiva espermática (VIJAYARAGHAVAN et al., 2000; APARICIO et al., 2007). Além disso, uma abordagem farmacológica confirmou um papel negativo da GSK3 na regulação da motilidade dos espermatozoides suínos (APARICIO et al., 2007). Ao mesmo tempo, a inibição da atividade da GSK3 β está relacionada com uma reduzida capacidade da célula espermática de passar pela reação acrossômica induzida pela progesterona (REID et al., 2015).

2.4.5 Motilidade espermática

O objetivo fundamental da célula espermática é transpor o material genético no gameta feminino. O espermatozoide, sendo uma célula altamente especializada, evoluiu para regular sua motilidade e conseguir encontrar o oócito. Sendo assim, a motilidade é uma das funções mais importantes do gameta masculino. Como mencionado anteriormente, a motilidade espermática hiperativada é um dos processos que acontecem durante a capacitação, sendo fundamental para a penetração espermática no oócito (GADELLA; FERRAZ, 2015). Além disso, os padrões de motilidade se alteram durante o trajeto desde o epidídimo até o local da fecundação (CARLSON et al., 2005). Isso ocorre porque o bicarbonato presente no plasma seminal ativa várias funções espermáticas que são essenciais para que a motilidade (LIU; WANG; CHEN, 2012).

A hiperativação é um padrão de motilidade em que o espermatozoide desenvolve no local e no momento da fertilização. Esse é um passo crítico para a fertilização bem-sucedida, uma vez que contribui para a capacidade dos espermatozoides de penetrar na zona pelúcida do oócito (SUAREZ, 2008). Esse padrão de motilidade é caracterizado por uma amplitude alta, assimétrica e com menor frequência do movimento flagelar (Figura 5) (SINGH; RAJENDER, 2015). O Ca^{2+} é um fator regulador fundamental para a hiperativação de espermatozoides (SANCHEZ-CARDENAS et al., 2018).

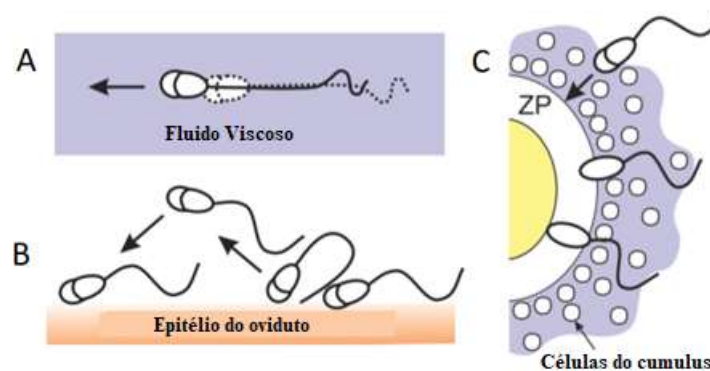
Figura 5 - (A) Espermatozoide com batimentos flagelares deficientes. (B) hipermotilidade: espermatozoide com batimento flagelar vigoroso e assimétrico, que é essencial para propagação através de fluido viscoso no oviduto.



Fonte: Adaptado de Singh e Rajender (2015)

Além de permitir a separação dos espermatozoides do reservatório, a hiperativação tem como papéis fisiológicos garantir um movimento progressivo alto em fluidos viscosos, tal como o muco cervical (Figura 6) (DARSZON et al., 2011). É também importante para facilitar a penetração do espermatozoide na matriz extracelular das células do cúmulo e do oócito, (Figura 6) (STAUSS; VOTTA; SUAREZ, 1995; DARSZON et al., 2011). Alguns camundongos transgênicos são inférteis devido aos defeitos de motilidade. Entretanto, em alguns casos, os espermatozoides são capazes de fertilizar oócitos livres de zona pelúcida, mas não oócitos intactos. Esse defeito foi atribuído a uma incapacidade específica para iniciar a motilidade hiperativada (LIVERA et al., 2005). Além disso, a energia oriunda da mitocôndria espermática é importante no processo de capacitação. Quando ocorre o bloqueio da mitocôndria, por exemplo, proporcionada pela presença de oligomycin A, a produção de energia mitocondrial, a motilidade e a capacitação *in vitro* são inviabilizadas (RAMIO-LLUCH et al., 2014).

Figura 6 - Importância da motilidade hiperativada. A) avançar em fluidos altamente viscoelásticos no genital feminino, B) liberar os espermatozoides do reservatório do istmo e avançar para a ampola (local de fertilização), e C) facilitar a penetração dos espermatozoides na zona pelúcida.



Fonte: Adaptado de Darson et al (2011)

2.4.6 Reação acrossômica

Um dos aspectos mais importantes da regulação da capacitação espermática dentro do oviduto é que os espermatozoides de mamíferos devem permanecer não-capacitados e com o acrossoma intactos até o momento de encontrar e fecundar o ócito (WASSARMAN; JOVINE; LITSCHER, 2004). *In vivo*, há ligantes que interagem com receptores acoplados à proteína G (GPCR's) e inibem as adenilil-ciclases associadas à membrana. Esses ligantes que inibem a reação acrossoma espontânea foram encontradas em suínos (FUNAHASHI et al., 2000). A inibição das adenilil-ciclases reduzem a produção de AMPc em espermatozoides capacitados e previne espontaneamente reações acrossômicas degenerativas (FRASER, L. R., 2010). Em suínos, essa atividade fisiológica da AMPc é necessária para manter a integridade da membrana do acrossoma (OGURA; TAKAGISHI; HARAYAMA, 2016).

A regulação defeituosa da capacitação espermática pode estar relacionada com a infertilidade. Assim, no sêmen humano foram observaram maiores porcentagens de espermatozoides capacitados e com reação acrossômica em homens inférteis que em férteis (FRASER; OSIGUWA, 2004). Esse achado sugere que os espermatozoides de homens inférteis podem sofrer capacitação antecipada e, portanto, morrer antes de encontrar um oócito. Diferentes causas poderiam explicar esse fenômeno, como a falta de fatores decapacitantes, falta de moduladores GPCR's ou problemas com os próprios GPCR's (FRASER, 2010).

Em suínos, o número de espermatozoides com reação acrossômica após a capacitação teve correlação positiva com o tamanho da leitegada (KWON et al., 2015). Segundo os autores, as diferenças encontradas nos espermatozoides com reação acrossômica e capacitados após a capacitação correlaciona-se significativamente com a fertilidade dos reprodutores. Assim, a proporção de espermatozoides que são capazes de passar pelo processo de capacitação pode servir como um indicador para a capacidade do espermatozoide de fertilizar o oócito.

O acrossoma é uma única vesícula secretora que recobre o núcleo da célula espermática da maioria dos animais e está localizado na região apical da cabeça do espermatozoide. Durante a reação acrossômica, a membrana plasmática da cabeça do espermatozoide começa a fundir-se com a membrana acrossomal externa em múltiplos locais, resultando na dispersão de conteúdo acrossômico (IKAWA et al., 2010; YESTE et al., 2013). Essa remodelação da membrana ocorre principalmente na membrana plasmática apical da cabeça, onde o espermatozoide interage com o oócito. Tal processo é importante para servir como local de sequestro e liberação de proteínas necessárias para a penetração da ZP e permitir que o espermatozoide se funda com o oócito (CABALLERO et al., 2012).

In vivo, o influxo de Ca^{2+} é o primeiro passo que ativa a complexa via que conduz à exocitose acrossomal (TSAI et al., 2012). Já a indução da reação acrossômica *in vitro*, em espermatozoides suínos pode ser alcançada pela adição de diferentes agentes ao meio de capacitação, incluindo o cálcio, a progesterona e proteínas da zona pelúcida (BERGER, 1989; LISHKO; BOTCHKINA; KIRICHOK, 2011), sendo a reação acrossômica induzida por progesterona um importante marcador de capacitação espermática (YESTE et al., 2015).

Durante o processo de reação acrossômica, a proacrosina (a forma inativa) é convertida em acrosina. O citoesqueleto de actina atua na regulação da exocitose do acrossoma. Durante a capacitação, a polimerização de actina é aumentada pelo aumento do pH, dos níveis de AMPc e pela ativação das vias PKA e PKC. Quando os espermatozoides capacitados são estimulados à realizarem a exocitose do acrossoma, ocorre rápida despolimerização da actina que parece estar relacionada ao aumento do cálcio citossólico. Se a despolimerização de actina é inibida, a exocitose do acrossoma induzida pela zona pelúcida é bloqueada (BREITBART; FINKELSTEIN, 2015). Isso mostra que o aumento da polimerização da actina é uma etapa essencial para o sucesso da fertilização (ICKOWICZ; FINKELSTEIN; BREITBART, 2012).

A progesterona é uma molécula que também participa da modulação da função espermática e da reação acrossômica. Esse hormônio está envolvido não apenas na capacitação, mas também em outros eventos, como motilidade hiperativada, flexão flagelar, na quimiotaxia, na reação acrossômica, na ligação espermatozóide-ZP e na fusão espermatozoide-oócito. Assim, a progesterona pode estimular a entrada de Ca^{2+} do meio extracelular, através dos canais CatSper (LISHKO; BOTCHKINA; KIRICHOK, 2011), ativar a proteína G e, conseqüentemente, o AMPc e as cascatas de sinalização, levando à reação acrossômica em espermatozoides humanos e de outros mamíferos (TEVES et al., 2009; SUMIGAMA et al., 2015).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A capacitação espermática é um processo pelo qual o espermatozoide é submetido a fim de adquirir a habilidade de fertilizar o oócito. Esse processo é complexo e envolve vários sinalizadores, como bicarbonato e a BSA, os quais vão agir em vias intracelulares e estimular as alterações espermáticas decorrentes da capacitação. Dentre as modificações, a alteração da estabilidade de membrana, a hiperativação e a reação acrossômica são as mais evidenciadas.

Assim, à partir dos trabalhos revisados, grandes progressos na pesquisa foram feitos nos últimos anos em fisiologia e tecnologia reprodutiva em suínos. No entanto, com base nos aspectos anteriormente mencionados, o conhecimento da capacitação espermática em suínos não está totalmente elucidado. A falta de conhecimento de muitos fatores envolvidos na capacitação *in vitro* de espermatozoides e sua regulação podem contribuir para a incidência anormalmente alta de polispermia nessa espécie. Além disso, o processo de fertilização *in vitro* ocasiona uma limitação para a produção *in vitro* de embriões devido ao fato de que os meios de capacitação disponíveis produzem uma grande porcentagem de espermatozoides capacitados que estão prontos para fertilizar ao mesmo tempo. A direção em que deve ser tomada é avançar no desenvolvimento de novas estratégias de modulação da capacitação espermática.

Para fazer isso, é necessário ajustar os parâmetros conhecidos envolvidos nos processos de capacitação *in vitro* de espermatozoides que estão longe de sua fisiologia *in vivo* e que poderiam estabelecer firmemente a base dessas técnicas na espécie suína. Assim, o conhecimento sobre a real importância do bicarbonato e a BSA no meio capacitante é um passo para um meio capacitante mais eficiente.

REFERÊNCIAS

- ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. 2018 Relatório Anual. .2018. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf>. Acesso em: 17.abril 2019.
- AITKEN, R. J.; NIXON, B. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. **Molecular Human Reproduction**, v. 19, n. 12, p. 785-793, 2013.
- APARICIO, I. M. et al. Porcine sperm motility is regulated by serine phosphorylation of the glycogen synthase kinase-3alpha. **Reproduction**, v. 134, n. 3, p. 435-444, 2007.
- ASQUITH, K. L.; BALEATO, R. M.; MCLAUGHLIN, E. A.; NIXON, B.; AITKEN, R. J. Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 16, p. 3645-3657, 2004.
- AUSTIN, C. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 4, p. 581-596, 1951.
- AVENARIUS, M. R. et al. Human male infertility caused by mutations in the CATSPER1 channel protein. **The American Journal of Human Genetics**, v. 84, n. 4, p. 505-510, 2009.
- BAILEY, J. L. Factors regulating sperm capacitation. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 56, n. 5, p. 334-348, 2010.
- BELENKY, M.; BREITBART, H. Role and regulation of Glycogen synthase kinase-3 beta in bovine spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 84, n. 1, p. 8-18, 2017.
- BERGER, T. Development of a zona-free hamster ova bioassay for goat sperm. **Theriogenology**, v. 32, n. 1, p. 69-77, 1989.
- BEUREL, E.; GRIECO, S. F.; JOPE, R. S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 148, n. 1, p. 114-131, 2015.
- BOERKE, A.; VAN DER LIT, J.; LOLICATO, F.; STOUT, T. A.; HELMS, J. B.; GADELLA, B. M. Removal of GPI-anchored membrane proteins causes clustering of lipid microdomains in the apical head area of porcine sperm. **Theriogenology**, v. 81, n. 4, p. 613-624, 2014.
- BRAGADO, M. J.; APARICIO, I. M.; GIL, M. C.; GARCIA-MARIN, L. J. Protein kinases A and C and phosphatidylinositol 3 kinase regulate glycogen synthase kinase-3A serine 21 phosphorylation in boar spermatozoa. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 109, n. 1, p. 65-73, 2010.
- BRAVO, M. M.; APARICIO, I. M.; GARCIA-HERREROS, M.; GIL, M. C.; PENA, F. J.; GARCIA-MARIN, L. J. Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation-like state in boar spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 71, n. 1, p. 88-96, 2005.
- BREITBART, H.; FINKELSTEIN, M. Regulation of Sperm Capacitation and the Acrosome Reaction by PIP 2 and Actin Modulation. **Asian Journal of Andrology**, v. 17, n. 4, p. 597-600, 2015.

- BROWN, S. G. et al. Complex CatSper-dependent and independent $[Ca^{2+}]_i$ signalling in human spermatozoa induced by follicular fluid. **Human Reproduction**, v. 32, n. 10, p. 1995-2006, 2017.
- BUFFONE, M. G.; WERTHEIMER, E. V.; VISCONTI, P. E.; KRAPP, D. Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 12, p. 2610-2620, 2014.
- CABALLERO, J. et al. Bovine sperm raft membrane associated Glioma Pathogenesis-Related 1-like protein 1 (GliPr1L1) is modified during the epididymal transit and is potentially involved in sperm binding to the zona pellucida. **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, n. 12, p. 3876-3886, 2012.
- CAMPAGNA, C.; GUILLEMETTE, C.; AYOTTE, P.; BAILEY, J. L. Effects of an environmentally relevant organochlorine mixture and a metabolized extract of this mixture on porcine sperm parameters in vitro. **Journal of Andrology**, v. 30, n. 3, p. 317-324, 2009.
- CARLSON, A. E.; QUILL, T. A.; WESTENBROEK, R. E.; SCHUH, S. M.; HILLE, B.; BABCOCK, D. F. Identical phenotypes of CatSper1 and CatSper2 null sperm. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 37, p. 32238-32244, 2005.
- CHANG, M. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. **Nature**, v. 168, n. 4277, p. 697, 1951.
- CHUNG, J. J.; NAVARRO, B.; KRAPIVINSKY, G.; KRAPIVINSKY, L.; CLAPHAM, D. E. A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa. **Nature Communications**, v. 2, n. 1, p. 153, 2011.
- CORREIA, J.; MICHELANGELI, F.; PUBLICOVER, S. Regulation and roles of Ca^{2+} stores in human sperm. **Reproduction**, v. 150, n. 2, p. R65-76, 2015.
- COSTELLO, S. et al. Ca^{2+} -stores in sperm: their identities and functions. **Reproduction**, v. 138, n. 3, p. 425-437, 2009.
- DARSZON, A.; NISHIGAKI, T.; BELTRAN, C.; TREVIÑO, C. L. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 4, p. 1305-1355, 2011.
- DE LA VEGA-BELTRAN, J. L. et al. Mouse sperm membrane potential hyperpolarization is necessary and sufficient to prepare sperm for the acrosome reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 53, p. 44384-44393, 2012.
- DUBE, C.; LECLERC, P.; BABA, T.; REYES-MORENO, C.; BAILEY, J. L. The proacrosin binding protein, sp32, is tyrosine phosphorylated during capacitation of pig sperm. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 4, p. 519-528, 2005.
- ESPINOSA, F. et al. A. Dual regulation of the T-type Ca^{2+} current by serum albumin and β -estradiol in mammalian spermatogenic cells. **FEBS Letters**, v. 475, n. 3, p. 251-256, 2000.
- FANG, X. et al. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 22, p. 11960-11965, 2000.

FLESCH; GADELLA. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, v. 1469, n. 3, p. 197-235, 2000.

FRASER, L. R.; OSIGUWA, O. O. Human sperm responses to calcitonin, angiotensin II and fertilization-promoting peptide in prepared semen samples from normal donors and infertility patients. **Human Reproduction**, v. 19, n. 3, p. 596-606, 2004.

FRASER, L. R. The "switching on" of mammalian spermatozoa: molecular events involved in promotion and regulation of capacitation. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 77, n. 3, p. 197-208, 2010.

FUNAHASHI, H.; ASANO, A.; FUJIWARA, T.; NAGAI, T.; NIWA, K.; FRASER, L. R. Both fertilization promoting peptide and adenosine stimulate capacitation but inhibit spontaneous acrosome loss in ejaculated boar spermatozoa in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 1, p. 117-124, 2000.

GADELLA; BOERKE, A. An update on post-ejaculatory remodeling of the sperm surface before mammalian fertilization. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 113-124, 2016.

GADELLA, B.; HARRISON, R. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. **Development**, v. 127, n. 11, p. 2407-2420, 2000.

GADELLA, B. M.; TSAI, P. S.; BOERKE, A.; BREWIS, I. A. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. **International Journal of Developmental Biology**, v. 52, n. 5-6, p. 473-480, 2008.

GADELLA, B. M.; FERRAZ, M. A. A Review of New Technologies that may Become Useful for in vitro Production of Boar Sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 2, p. 61-70, 2015.

GANGWAR, D. K.; ATREJA, S. K. Signalling Events and Associated Pathways Related to the Mammalian Sperm Capacitation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 5, p. 705-711, 2015.

GERVASI, M. G.; VISCONTI, P. E. Chang's meaning of capacitation: A molecular perspective. **Molecular Reproduction and Development** v. 83, n. 10, p. 860-874, 2016.

GONG, Y.; GUO, H.; ZHANG, Z.; ZHOU, H.; ZHAO, R.; HE, B. Heat Stress Reduces Sperm Motility via Activation of Glycogen Synthase Kinase-3alpha and Inhibition of Mitochondrial Protein Import. **Frontiers in physiology**, v. 8, n. 1, p. 718, 2017.

HARAYAMA, H. Roles of intracellular cyclic AMP signal transduction in the capacitation and subsequent hyperactivation of mouse and boar spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, v. 59, n. 5, p. 421-430, 2013.

HARRISON, R. A.; GADELLA, B. M. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 342-351, 2005.

HUNTER, R. H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Capacitation of mammalian spermatozoa in vivo, with a specific focus on events in the Fallopian tubes. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 67, n. 2, p. 243-250, 2004.

ICKOWICZ, D.; FINKELSTEIN, M.; BREITBART, H. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. **Asian Journal of Andrology**, v. 14, n. 6, p. 816-821, 2012.

IKAWA, M.; INOUE, N.; BENHAM, A. M.; OKABE, M. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 4, p. 984-994, 2010.

JAGAN MOHANARAO, G.; ATREJA, S. K. Identification of capacitation associated tyrosine phosphoproteins in buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 123, n. 1-2, p. 40-47, 2011.

JAISWAL, D.; SINGH, V.; DWIVEDI, U. S.; TRIVEDI, S.; SINGH, K. Chromosome microarray analysis: a case report of infertile brothers with CATSPER gene deletion. **Gene**, v. 542, n. 2, p. 263-265, 2014.

JONES, R. et al. The equatorial subsegment in mammalian spermatozoa is enriched in tyrosine phosphorylated proteins. **Biology of Reproduction**, v. 79, n. 3, p. 421-431, 2008.

KAWANO, N.; YOSHIDA, K.; MIYADO, K.; YOSHIDA, M. Lipid rafts: keys to sperm maturation, fertilization, and early embryogenesis. **Journal of Lipids**, v. 2011, n., p. 264706, 2011.

KIRICHOK, Y.; NAVARRO, B.; CLAPHAM, D. E. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. **Nature**, v. 439, n. 7077, p. 737-740, 2006.

KWON, W. S.; PARK, Y. J.; MOHAMED EL, S. A.; PANG, M. G. Voltage-dependent anion channels are a key factor of male fertility. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 2, p. 354-361, 2013.

KWON, W. S.; RAHMAN, M. S.; LEE, J. S.; YOU, Y. A.; PANG, M. G. Improving litter size by boar spermatozoa: application of combined H33258/CTC staining in field trial with artificial insemination. **Andrology**, v. 3, n. 3, p. 552-557, 2015.

LACKEY, B. R.; GRAY, S. L. Identification of kinases, phosphatases, and phosphorylation sites in human and porcine spermatozoa. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 61, n. 6, p. 345-352, 2015.

LEAHY, T.; GADELLA, B. M. New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane. **Asian Journal of Andrology**, v. 17, n. 4, p. 561-567, 2015.

LISHKO, P. V.; BOTCHKINA, I. L.; KIRICHOK, Y. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. **Nature**, v. 471, n. 7338, p. 387-391, 2011.

LISHKO, P. V.; KIRICHOK, Y.; REN, D.; NAVARRO, B.; CHUNG, J. J.; CLAPHAM, D. E. The control of male fertility by spermatozoan ion channels. **Annual Review of Physiology**, v. 74, n. 1, p. 453-475, 2012.

LIU, Y.; WANG, D. K.; CHEN, L. M. The physiology of bicarbonate transporters in mammalian reproduction. **Biology of reproduction**, v. 86, n. 4, p. 99, 2012.

LIVERA, G. et al. Inactivation of the mouse adenylyl cyclase 3 gene disrupts male fertility and spermatozoon function. **Molecular Endocrinology**, v. 19, n. 5, p. 1277-1290, 2005.

MARTINEZ-ABAD, S.; CASTILLO-MARTIN, M.; GADANI, B.; RODRIGUEZ-GIL, J. E.; BONET, S.; YESTE, M. Voltage-dependent anion channel 2 is involved in in vitro capacitation of boar sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 4, p. 65-68, 2017.

MILLER, D.; OSTERMEIER, G. C. Spermatozoal RNA: Why is it there and what does it do? **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v. 34, n. 9, p. 840-846, 2006.

MORENO, R. D.; ALVARADO, C. P. The mammalian acrosome as a secretory lysosome: new and old evidence. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 73, n. 11, p. 1430-1434, 2006.

MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v. 3, n. 5, p. 403-439, 1997.

NARESH, S.; ATREJA, S. K. The protein tyrosine phosphorylation during in vitro capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa. **Cryobiology**, v. 70, n. 3, p. 211-216, 2015.

NAVARRETE, F. A et al. Biphasic role of calcium in mouse sperm capacitation signaling pathways. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, n. 8, p. 1758-1769, 2015.

NAZ, R. K.; RAJESH, P. B. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, n. 1, p. 75, 2004.

NERI-VIDAURRI PDEL, C.; TORRES-FLORES, V.; GONZALEZ-MARTINEZ, M. T. A remarkable increase in the pHi sensitivity of voltage-dependent calcium channels occurs in human sperm incubated in capacitating conditions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 343, n. 1, p. 105-109, 2006.

NEWTON, L. D. et al. Na⁺/K⁺ATPase regulates sperm capacitation through a mechanism involving kinases and redistribution of its testis-specific isoform. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 77, n. 2, p. 136-148, 2010.

OGURA, Y.; TAKAGISHI, Y.; HARAYAMA, H. Changes in the distribution and molecular mass of boar sperm acrosome-associated 1 proteins during the acrosome reaction; their validity as indicators for occurrence of the true acrosome reaction. **Animal Reproduction Science**, v. 172, n. 1, p. 94-104, 2016.

OKAMURA, N.; TAJIMA, Y.; SOEJIMA, A.; MASUDA, H.; SUGITA, Y. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 17, p. 9699-9705, 1985.

OSTERMEIER, G. C. et al. Timing of sperm capacitation varies reproducibly among men. **Molecular Reproduction and Development**, v. 85, n. 5, p. 387-396, 2018.

PETRUNKINA, A. M.; SIMON, K.; GÜNZEL-APEL, A. R.; TÖPFER-PETERSEN, E. Specific order in the appearance of protein tyrosine phosphorylation patterns is functionally coordinated with dog sperm hyperactivation and capacitation. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 3, p. 423-437, 2003.

QI, H. et al. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 4, p. 1219-1223, 2007.

RAHMAN, M. S.; KWON, W. S.; PANG, M. G. Calcium influx and male fertility in the context of the sperm proteome: an update. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 1, p. 841615, 2014.

RAMIO-LLUCH, L. et al. 'In vitro' capacitation and acrosome reaction are concomitant with specific changes in mitochondrial activity in boar sperm: evidence for a nucleated mitochondrial activation and for the existence of a capacitation-sensitive subpopulational structure. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 4, p. 664-673, 2011.

RAMIO-LLUCH, L.; FERNANDEZ-NOVELL, J. M.; PENA, A.; RAMIREZ, A.; CONCHA, II; RODRIGUEZ-GIL, J. E. 'In vitro' capacitation and further 'in vitro' progesterone-induced acrosome exocytosis are linked to specific changes in the expression and acrosome location of protein phosphorylation in serine residues of boar spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 5, p. 766-776, 2012a.

RAMIO-LLUCH, L.; FERNANDEZ-NOVELL, J. M.; PENA, A.; BUCCI, D.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GIL, J. E. "In vitro" capacitation and subsequent acrosome reaction are related to changes in the expression and location of midpiece actin and mitofusin-2 in boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 77, n. 5, p. 979-988, 2012b.

RAMIO-LLUCH, L. et al. Oligomycin A-induced inhibition of mitochondrial ATP-synthase activity suppresses boar sperm motility and in vitro capacitation achievement without modifying overall sperm energy levels. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 6, p. 883-897, 2014.

REID, A. T. et al. Glycogen synthase kinase 3 regulates acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa via dynamin phosphorylation. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 7, p. 2872-2882, 2015.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Role of the oviduct in sperm capacitation. **Theriogenology**, v. 68, n. 1, p. S138-146, 2007.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; EKSTEDT, E.; EINARSSON, S. Acidification of epididymal fluid in the boar. **International Journal of Andrology**, v. 13, n. 3, p. 238-243, 1990.

ROMAR, R.; FUNAHASHI, H.; COY, P. In vitro fertilization in pigs: New molecules and protocols to consider in the forthcoming years. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 125-134, 2016.

ROMAROWSKI, A. et al. PKA-dependent phosphorylation of LIMK1 and Cofilin is essential for mouse sperm acrosomal exocytosis. **Developmental Biology**, v. 405, n. 2, p. 237-249, 2015.

SALMON, V. M.; LECLERC, P.; BAILEY, J. L. Cholesterol-Loaded Cyclodextrin Increases the Cholesterol Content of Goat Sperm to Improve Cold and Osmotic Resistance and Maintain Sperm Function after Cryopreservation. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 4, p. 85, 2016.

SANCHEZ-CARDENAS, C. et al. Intracellular Ca²⁺ threshold reversibly switches flagellar beat off and on. **Biology of Reproduction**, v. 99, n. 5, p. 1010-1021, 2018.

SELVARAJ, V.; ASANO, A.; BUTTKE, D. E.; SENGUPTA, P.; WEISS, R. S.; TRAVIS, A. J. Mechanisms underlying the micron-scale segregation of sterols and GM1 in live mammalian sperm. **Journal of Cellular Physiology** v. 218, n. 3, p. 522-536, 2009.

SIGNORELLI, J.; DIAZ, E. S.; MORALES, P. Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. **Cell and Tissue Research**, v. 349, n. 3, p. 765-782, 2012.

- SILVA, P. F.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, n. 5, p. 958-978, 2006.
- SINGH, A. P.; RAJENDER, S. CatSper channel, sperm function and male fertility. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 30, n. 1, p. 28-38, 2015.
- SMITH, J. F. et al. Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca²⁺ channel in a CatSper2-deficient infertile patient. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 17, p. 6823-6828, 2013.
- SONG, C. et al. Molecular cloning, spatial and temporal expression analysis of CatSper genes in the Chinese Meishan pigs. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, n. 1, p. 132, 2011.
- SORIANO-UBEDA, C.; ROMERO-AGUIRREGOMEZCORTA, J.; MATAS, C.; VISCONTI, P. E.; GARCIA-VAZQUEZ, F. A. Manipulation of bicarbonate concentration in sperm capacitation media improves in vitro fertilisation output in porcine species. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 19, 2019.
- STAUSS, C. R.; VOTTA, T. J.; SUAREZ, S. S. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 6, p. 1280-1285, 1995.
- STIVAL, C.; PUGA MOLINA LDEL, C.; PAUDEL, B.; BUFFONE, M. G.; VISCONTI, P. E.; KRAPF, D. Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Sperm. **Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology**, v. 220, n. 1, p. 93-106, 2016.
- STIVAL, C. et al. Disruption of protein kinase A localization induces acrosomal exocytosis in capacitated mouse sperm. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 24, p. 9435-9447, 2018.
- SUAREZ, S. S. Control of hyperactivation in sperm. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 6, p. 647-657, 2008.
- SUMIGAMA, S. et al. Progesterone Accelerates the Completion of Sperm Capacitation and Activates CatSper Channel in Spermatozoa from the Rhesus Macaque. **Biology of Reproduction**, v. 93, n. 6, p. 130, 2015.
- TAJIMA, Y.; OKAMURA, N.; SUGITA, Y. The activating effects of bicarbonate on sperm motility and respiration at ejaculation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 924, n. 3, p. 519-529, 1987.
- TARDIF, S.; DUBÉ, C.; BAILEY, J. L. Porcine Sperm Capacitation and Tyrosine Kinase Activity Are Dependent on Bicarbonate and Calcium but Protein Tyrosine Phosphorylation Is Only Associated with Calcium¹. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 1, p. 207-213, 2003.
- TATENO, H. et al. Ca²⁺ ionophore A23187 can make mouse spermatozoa capable of fertilizing in vitro without activation of cAMP-dependent phosphorylation pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 46, p. 18543-18548, 2013.
- TEVES, M. E. et al. Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone. **PLoS One**, v. 4, n. 12, p. e8211, 2009.
- TSAI, P. S.; BREWIS, I. A.; VAN MAAREN, J.; GADELLA, B. M. Involvement of complexin 2 in docking, locking and unlocking of different SNARE complexes during sperm capacitation and induced acrosomal exocytosis. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e32603, 2012.

VADNAIS, M. L.; GALANTINO-HOMER, H. L.; ALTHOUSE, G. C. Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation. **Archives of Andrology**, v. 53, n. 3, p. 109-123, 2007.

VICENTE-CARRILLO, A.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. The CatSper channel modulates boar sperm motility during capacitation. **Reproductive Biology**, v. 17, n. 1, p. 69-78, 2017.

VIJAYARAGHAVAN, S., MOHAN, J., GRAY, H., KHATRA, B., CARR, D. W. A role for phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 α in bovine sperm motility regulation. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 6, p. 1647-1654, 2000.

VILAGRAN, I.; YESTE, M.; SANCHO, S.; CASAS, I.; RIVERA DEL ALAMO, M. M.; BONET, S. Relationship of sperm small heat-shock protein 10 and voltage-dependent anion channel 2 with semen freezability in boars. **Theriogenology**, v. 82, n. 3, p. 418-426, 2014.

VISCONTI, P. E. et al. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm β -cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 5, p. 3235-3242, 1999.

VISCONTI, P. E. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 3, p. 667-668, 2009.

VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 1, p. 1-6, 1998.

WANG, X. F. et al. Involvement of CFTR in uterine bicarbonate secretion and the fertilizing capacity of sperm. **Nature Cell Biology**, v. 5, n. 10, p. 902-906, 2003.

WASSARMAN, P. M.; JOVINE, L.; LITSCHER, E. S. Mouse zona pellucida genes and glycoproteins. **Cytogenetic and Genome Research** v. 105, n. 2-4, p. 228-234, 2004.

WENNEMUTH, G. Bicarbonate actions on flagellar and Ca²⁺-channel responses: initial events in sperm activation. **Development**, v. 130, n. 7, p. 1317-1326, 2003.

WILLIAMS, H. L. et al. Specific loss of CatSper function is sufficient to compromise fertilizing capacity of human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 30, n. 12, p. 2737-2746, 2015.

XIA, J.; REN, D. The BSA-induced Ca²⁺ influx during sperm capacitation is CATSPER channel-dependent. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, n. 1, p. 119, 2009.

YANAGIMACHI, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. **Zygote**, v. 2, n. 4, p. 371-372, 1994.

YESTE, M.; ESTRADA, E.; CASAS, I.; BONET, S.; RODRIGUEZ-GIL, J. E. Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels. **Theriogenology**, v. 79, n. 6, p. 929-939, 2013.

YESTE, M. et al. Intracellular calcium movements of boar spermatozoa during 'in vitro' capacitation and subsequent acrosome exocytosis follow a multiple-storage place, extracellular calcium-dependent model. **Andrology**, v. 3, n. 4, p. 729-747, 2015.

ZHOU, J. et al. The Semen pH Affects Sperm Motility and Capacitation. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0132974, 2015.

SEGUNDA PARTE**ARTIGO****Effects of different concentrations of bicarbonate and bovine serum albumin on *in vitro* capacitation and progesterone-induced acrosome exocytosis of boar spermatozoa*****Normas da Revista *Frontiers in Physiology***

Bruna Resende Chaves^{1,4}, Ana Paula Pinoti Pavaneli^{2,4}, Joan E. Rodríguez-Gil³, Sergi Bonet⁴, Márcio Gilberto Zangeronimo¹, Marc Yeste^{4,*}

¹*Medicine Veterinary Department, Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brazil*

²*Laboratory of Andrology and Technology of Swine Embryos, Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brazil*

³*Department of Animal Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Autonomous University of Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Spain.*

⁴*Biotechnology of Animal and Human Reproduction (TechnoSperm), Department of Biology, Institute of Food and Agricultural Technology, Faculty of Sciences, University of Girona, Girona, Spain*

***Corresponding author**

Marc Yeste, Faculty of Sciences, Unit of Cell Biology, Department of Biology, University of Girona, C/Maria Aurèlia Campany, 69, Campus Montilivi, E-17003 Girona, Spain. Electronic address: marc.yeste@udg.edu

1 **1 Introduction**

2

3 Mammalian spermatozoa are unable to fertilize oocytes upon ejaculation, because,
4 although they have already acquired motility and completed their epididymal maturation,
5 they still require to reside within the female reproductive tract and interact with that
6 environment (Gervasi and Visconti, 2016). Within the oviduct, spermatozoa undergo
7 capacitation, which was first described in the 1950s (Chang 1951; Austin 1951) and
8 includes sperm reservoir releasing, surface acrosome remodeling and sperm membrane
9 preparation for the oocyte fusion (Buffone et al., 2014). This preparation of the sperm cell
10 to interact with oocyte vestments, undergo acrosome exocytosis, and fuse with its
11 oolemma consists of a series of physiological and biochemical changes that include,
12 amongst others, changes in the composition of sperm plasma membrane, mitochondrial
13 activity and in the sperm motility pattern; increase of intracellular Ca^{2+} and ROS levels;
14 cholesterol efflux; and tyrosine-phosphorylation of certain sperm proteins (Yeste, 2013;
15 Yeste et al., 2015; Betarelli et al., 2018; Rocco et al., 2018).

16 Sperm capacitation can be performed *in vitro* in several, although not all, mammalian
17 species. Because effective *in vitro* sperm capacitation is required for successful *in vitro*
18 fertilization (IVF), the main attempts to establish a proper capacitation medium have been
19 related to the development of this assisted reproductive technique. All these previous
20 studies have aimed to set a medium that mimics the oviduct environment, where
21 capacitation takes place (Yeste, 2013). At present, it is widely accepted that any
22 capacitation medium should contain a protein source, which is usually bovine serum
23 albumin (BSA); and a variety of ions, including bicarbonate (HCO_3^-) and Ca^{2+} (Salicioni
24 et al., 2007; Visconti 2009; Stival et al., 2018). BSA is associated with the extraction of
25 cholesterol from the plasma membrane, which alters its fluidity and makes it more able

26 to fuse with other membranes, such as the outer acrosome membrane and oolemma
27 (Visconti and Kopf, 1998; Gadella and Van Gestel, 2004; Gangwar and Atreja, 2015).
28 On the other hand, high levels of HCO_3^- destabilize the sperm plasma membrane and
29 trigger a signaling cascade that involves increases in cAMP levels and activation of
30 protein kinase A (PKA) (Naz and Rajesh, 2004) and ultimately results in acrosome
31 exocytosis (Rodríguez-Martínez 2007).

32 In addition to the aforementioned, concentration of HCO_3^- changes across epididymal
33 regions (3-4 mM) and in the oviductal fluid, this variation playing a crucial role for sperm
34 maturation in the epididymis, acquisition of sperm motility upon ejaculation, and
35 modulation of sperm capacitation within the female reproductive tract (Rodríguez-
36 Martínez et al., 2007). After ejaculation, the sperm encounter a high HCO_3^- concentration
37 in the female tract ranging between 35~90 mol/L (Rodríguez-Martínez et al., 1990;
38 Visconti 2009). *In vitro*, these variations in HCO_3^- concentration do not exist, but rather
39 spermatozoa are exposed to a standard concentration throughout all the process (Soriano-
40 Úbeda et al., 2019).

41 Previous studies have utilized different concentrations of bicarbonate and BSA to
42 capacitate boar spermatozoa *in vitro*. In effect, some studies used a medium that contained
43 25 mM NaHCO_3 and 0.4% BSA (Tardif et al., 2001), 25 mM NaHCO_3 and 0.6% BSA
44 (Tardif et al., 2004), whereas others utilized 36-38 mM NaHCO_3 and 5mg/mL of BSA (
45 Fàbrega et al., 2011; Puigmulé et al., 2011; Yeste et al., 2015; Rocco et al., 2018). Other
46 authors even found that a medium without NaHCO_3 and with 5 mg/mL BSA was able, in
47 the presence of an atmosphere containing 5% CO_2 , to capacitate boar spermatozoa
48 (Ramió-Lluch et al., 2011; Ramió-Lluch et al., 2014; Ramió-Lluch et al., 2019).
49 Therefore, and because to best of our knowledge no study has compared the impact of
50 different concentrations of bicarbonate and BSA, this work aimed to elucidate to which

51 extent these two components are crucial for boar sperm to reach the capacitation status
52 and to undergo progesterone-induced acrosome exocytosis.

53

54 **2 Materials and Methods**

55 **2.1 Reagents**

56

57 Unless otherwise indicated, all reagents used in this study were purchased from Sigma–
58 Aldrich (Saint- Louis, Missouri, USA) and Merck (Darmstadt, Germany)

59

60 **2.2 Semen samples**

61

62 A total of 12 semen samples coming from 12 separate boars of proven fertility according
63 to the farm records were used in this study. Ejaculates were obtained from a local farm
64 (Servicios Geneticos Porcinos, S.L., Roda de Ter, Spain) from boars that were routinely
65 collected twice a week through the gloved-hand method. The animals were fed with a
66 standard diet and provided with water *ad libitum*. Sperm-rich fractions were diluted with
67 a commercial extender (Duragen[®]; Magapor, S.L.; Ejea de los Caballeros, Spain) to a
68 final sperm concentration of 3.3×10^7 spermatozoa/mL. Following this, samples were
69 cooled down to 17°C, packed into 90-mL doses and finally transported in an insulated
70 container at 17°C for approximately 45 min, which was the time required to arrive to the
71 laboratory. Upon arrival, sperm quality was evaluated to confirm that conventional
72 spermogram parameters were above quality standards (total motile spermatozoa $\geq 80\%$;
73 progressive sperm motility $\geq 60\%$; morphologically normal spermatozoa $\geq 85\%$; viable
74 spermatozoa $\geq 80\%$).

75

76 **2.3 In vitro capacitation and progesterone-induced acrosome exocytosis**

77

78 As aforementioned, this experiment analyzed the effect of different concentrations of
79 bicarbonate and bovine serum albumin (BSA) on *in vitro* capacitation and further
80 progesterone-induced acrosome exocytosis. All mediums were freshly prepared on the
81 day of use and consisted of Tyrode's medium containing lactate and pyruvate, and
82 different concentrations of bicarbonate and BSA. The composition of this basic medium
83 was: 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) buffer, 112
84 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 5 mM glucose, 0.3 mM NaHPO₄, 0.4 mM MgSO₄, 4.5 mM
85 CaCl₂, 21.7 mM C₃H₅NaO₃, and 1 mM C₃H₃NaO₃. Eight different treatments were tested:
86 1) negative control (No BSA / No Bic), which was the basic medium without bicarbonate
87 or BSA; 2) basic medium supplemented with 5 mg/mL BSA only (BSA / No Bic); 3)
88 basic medium supplemented with 5 mM NaHCO₃ and 5 mg/mL BSA (BSA + 5 mM Bic);
89 4) basic medium supplemented with 5 mM NaHCO₃ only (No BSA + 5 mM Bic); 5) basic
90 medium supplemented with 15 mM NaHCO₃ and 5 mg/mL BSA (BSA + 15 mM Bic);
91 6) basic medium supplemented with 15 mM NaHCO₃ only (No BSA + 15 mM Bic); 7)
92 basic medium supplemented with 38 mM NaHCO₃ and 5 mg/mL BSA (BSA + 38 mM
93 Bic); and 8) basic medium supplemented with 38 mM NaHCO₃ only (No BSA + 38 mM
94 Bic). The pH of all media was previously adjusted to 7.4 and media were equilibrated at
95 38.5°C and 5% CO₂ for 1 h before use.

96 Seminal doses were centrifuged at 600×g and 17°C for 10 min, washed with PBS, and
97 resuspended with the aforementioned media to a final concentration of 2×10⁷
98 spermatozoa/mL. Spermatozoa were incubated at 38.5 °C and 5% CO₂ in humidified air
99 and evaluated at 0, 2 and 4 h. After 4 h of incubation, progesterone (final concentration:
100 10 µg/mL) was added to induce the acrosome reaction (Jiménez et al., 2003; Ramió et al.,

101 2008). Spermatozoa were further incubated under the same conditions and evaluated after
102 5, 30 and 60 min of progesterone addition. At each relevant time point, separate aliquots
103 were taken for the evaluation of sperm motility, sperm viability, acrosome integrity,
104 membrane lipid disorder, intracellular calcium levels, and mitochondrial membrane
105 potential. Another aliquot was also taken for protein extraction and analysis. In this latter
106 case, aliquots were centrifuged at $2,400\times g$ and 17°C for 5 min and supernatants were
107 discarded. Pellets were stored at -80°C until protein extraction.

108

109 **2.4 Sperm motility**

110

111 The evaluation of sperm motility was performed by CASA (Integrated Sperm Analysis
112 System V1.0; Proiser, Valencia, Spain). Briefly, samples were previously incubated at
113 37°C for 10 min in a water bath and the analysis was done using the Makler counting
114 chamber (Sefi-Medical Instruments), in which it placed $20\ \mu\text{L}$ of sperm and observed at
115 $100\times$ magnification of in a negative phase-contrast microscopy. Per sample, three
116 replicates a minimum of 1000 spermatozoa were evaluated and time point were evaluated,
117 prior to calculating the corresponding mean \pm SEM. Sperm motility descriptors obtained
118 were those described in Yeste et al. (2008). The analysed parameter ranges were:
119 curvilinear velocity (VCL), the mean path velocity of the sperm head along its actual
120 trajectory ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$); linear velocity (VSL), the mean path velocity of the sperm head along
121 a straight line from its first to its last position ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$); mean velocity (VAP), the mean
122 velocity of the sperm head along its average trajectory ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$); linearity coefficient
123 (LIN), $(\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100$ (%); straightness coefficient (STR): $(\text{VSL}/\text{VAP}) \times 100$ (%);
124 wobble coefficient (WOB), $(\text{VAP}/\text{VCL}) \times 100$ (%); mean amplitude of lateral head
125 displacement (ALH), the mean value of the extreme side-to-side movement of the sperm

126 head in each beat cycle (μm); and frequency of head displacement (BCF), the frequency
127 with which the actual sperm trajectory crosses the average path trajectory (Hz). Total
128 motility was defined as the percentage of spermatozoa showing a VAP above $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$,
129 a progressive motility spermatozoa was that showing a VAP higher than $45 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

130

131 **2.5 Flow cytometry analyses**

132

133 Information about flow cytometry analyses performed in the present study is provided
134 according to the recommendations of the International Society for Advancement of
135 Cytometry (ISAC; see Lee et al., 2008). Flow cytometry was used to evaluate sperm
136 viability, sperm-membrane lipid disorder, potential of mitochondrial membrane and
137 intracellular calcium levels in all samples and time-points. Prior to evaluation, sperm
138 concentration was adjusted to 1×10^6 spermatozoa $\cdot\text{mL}^{-1}$ in a final volume of 0.5 mL as in
139 Yeste et al. (2013). Spermatozoa were then stained with the appropriate combinations of
140 fluorochromes, following the protocols described below. In all cases, a minimum of
141 10,000 events per replicate were evaluated and samples were calculated using Cell Lab
142 Quanta SC Flow Cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) through excitement
143 with an argon ion laser (488 nm) set at a power of 22mW. Cell diameter/volume was
144 directly measured with a Cell Lab Quanta™ SC cytometer employing the Coulter
145 principle for volume assessment. This system has forward scatter (FS) replaced by
146 electronic volume (EV). The EV channel was periodically calibrated using 10- μm Flow-
147 Check fluorospheres (Beckman Coulter) by positioning this size of the bead at channel
148 200 on the volume scale. Three optical filters with the following characteristics were
149 used: Green fluorescence (FL-1): Dichroic/Splitter, DRLP: 550 nm, BP filter: 525 nm,
150 detection width 505-545 nm; Orange fluorescence (FL-2): DRLP: 600 nm, BP filter: 575

151 nm, detection width: 560-590 nm); Red fluorescence (FL-3): LP filter: 670 nm, detection
152 width: 655-685 nm. Signals were logarithmically amplified and photomultiplier settings
153 were adjusted to particular staining methods. FL-1 was used to detect green fluorescence
154 (SYBR14, PNA-FITC, YO-PRO-1, Fluo-3, JC-1 monomers), FL2 was utilised to detect
155 JC-1 aggregates and FL3 was used to detect red fluorescence (IP, Merocyanine-540,
156 Rhod-5N). The analyser threshold was adjusted on the EV channel to exclude subcellular
157 debris (particle diameter < 7 μm) and cell aggregates (particle diameter > 12 μm) and sperm-
158 specific events were positively gated on the basis of EV/SS distributions. Obtained data
159 were corrected according to the procedure described by Petrunkina et al. (2010). Each
160 assessment per sample and parameter was repeated three times in independent tubes, prior
161 to calculating the corresponding mean \pm SEM.

162

163 **2.6 Evaluation of sperm viability**

164

165 Sperm viability was evaluated using the LIVE/DEAD Sperm Viability Kit (SYBR14/ PI)
166 following the protocol set in Garner and Johnson (1995). With this purpose, sperm
167 samples were incubated with SYBR14 (final concentration = 100 nM) for 10 min in
168 darkness at 38 °C and then with propidium iodide (PI; final concentration = 10 μM) at the
169 same temperature for 5 min. In this probe, flow-cytometry dot plots yielded four
170 differentiated sperm populations: (i) Membrane-intact spermatozoa were positive for
171 SYBR-14 and negative for PI, green-stained (SYBR-14⁺/PI⁻); (ii) non-viable
172 spermatozoa, red-stained (SYBR14⁻/PI⁺) and (iii) non-viable spermatozoa that were
173 stained both in green and in red (SYBR14⁺/PI⁺). Unstained and single-stained samples
174 were used for setting the electronic volume (EV) gain, FL-1 and FL-3 PMT-voltages and
175 for compensation of YO-PRO-1 spill over into the PI channel.

176 **2.7 Evaluation of sperm membrane lipid disorder**

177

178 Sperm lipid disorder of boar sperm membrane was determined by measuring with
179 merocyanine 540 (M540) and YO-PRO-1, following a procedure by Harrison et al.
180 (1996). Briefly, spermatozoa were stained with M540 (final concentration: 2.6 μ M) and
181 YO-PRO-1 (final concentration: 25 nM) and incubated at 38 °C for 10 min in the dark. A
182 total of four sperm populations were identified: (i) non-viable spermatozoa with low
183 membrane lipid disorder (M-540⁻/YO-PRO-1⁺), (ii) non-viable spermatozoa with high
184 membrane lipid disorder (M-540⁺/YO-PRO-1⁺), (iii) viable spermatozoa with low
185 membrane lipid disorder (M-540⁻/YO-PRO-1⁻), and (iv) viable spermatozoa with high
186 membrane lipid disorder (M-540⁺/YO-PRO-1⁻). Data were not compensated.

187

188 **2.8 Evaluation of sperm acrosome integrity**

189

190 Acrosome integrity was determined through PNA-FITC/PI. In this case, spermatozoa
191 were stained with the lectin from *Arachis hypogaea* (peanut agglutinin, PNA) conjugated
192 with fluorescein isothiocyanate (FITC) and with PI, according to the modified procedure
193 described by Nagy et al. (2003). Briefly, spermatozoa were stained with PNA-FITC (final
194 concentration: 2.5 μ g \cdot mL⁻¹) and PI (final concentration: 10 μ M) and incubated at 38°C for
195 5min in the dark. PNA-FITC fluorescence was collected through FL-1 and PI
196 fluorescence was detected through FL-3. As spermatozoa were not previously
197 permeabilised, they were identified and placed in one of the four following populations:
198 (i) spermatozoa with intact plasma membrane (PNA-FITC⁻/PI⁻); (ii) spermatozoa with
199 damaged plasma membrane that presented an outer acrosome membrane that could not
200 be fully intact (PNA-FITC⁺/PI⁺); (iii) spermatozoa with damaged plasma membrane and

201 lost outer acrosome membrane (PNA-FITC⁻/PI⁺); and (iv) spermatozoa with damaged
202 plasma membrane (PNA-FITC⁺/PI⁻). Unstained and single-stained samples were used for
203 setting the electronic volume (EV) gain, FL-1 and FL-3 PMT-voltages and for
204 compensation of PNA-FITC spill over into the PI channel.

205

206 **2.9 Evaluation of intracellular calcium levels**

207

208 Intracellular calcium levels were evaluated with two different markers (Fluo3 and
209 Rhod5). Fluo3 staining was performed following the protocol described by Harrison et
210 al. (1993) and modified by Kadirvel et al. (2009), whereas Rhod5 staining was performed
211 following the protocol described by Yeste et al. (2015). Whereas Fluo3 has more affinity
212 for the Ca²⁺ stored in the mid-piece, Rhod5 preferentially stains that stored in the sperm
213 head (Yeste et al., 2015).

214 Intracellular calcium levels in boar sperm were stained with Fluo-3, and sperm membrane
215 integrity was evaluated with PI. Sperm samples were incubated at 38 °C for 10 min in the
216 dark with Fluo-3-AM (final concentration: 1µM) and PI (final concentration: 12µM).
217 After analysis, four different sperm populations were observed: (i) viable spermatozoa
218 with low levels of intracellular calcium (Fluo-3⁻/PI⁻); (ii) viable spermatozoa with high
219 levels of intracellular calcium (Fluo-3⁺/PI⁻); (iii) non-viable spermatozoa with low levels
220 of intracellular calcium (Fluo-3⁻/PI⁺), and (iv) non-viable spermatozoa with high levels
221 of intracellular calcium (Fluo-3⁺/PI⁺). Unstained and single-stained samples were used
222 for setting the EV-gain, FL-1 and FL-3 PMT voltages and for compensating Fluo-3 spill
223 over into the FL3-channel and PI spill-over into the FL1-channel.

224 For evaluating intracellular calcium levels were stained with Rhod-5N, and YO-PRO-1
225 was used to evaluate sperm membrane integrity. With this purpose, boar spermatozoa

226 were stained with Rhod-5N-AM (final concentration: 5 μ M) and YO-PRO-1 (final
227 concentration: 25nM) and incubated at 38 °C for 10 min in the dark. Again, a total of four
228 sperm populations were identified: (i). viable spermatozoa with low levels of intracellular
229 calcium (Rhod-5N⁻/YO-PRO-1⁻); (ii) viable spermatozoa with high levels of intracellular
230 calcium (Rhod-5N⁺/YO-PRO-1⁻); (iii). non-viable spermatozoa with low levels of
231 intracellular calcium (Rhod-5N⁻/YO-PRO-1⁺), and (iv). non-viable spermatozoa with
232 high levels of intracellular calcium (Rhod-5N⁺/YO-PRO-1⁺). Fluorescence from Rhod-
233 5N was compensated for through the FL1-channel.

234

235 **2.10 Evaluation of Mitochondrial Membrane Potential**

236

237 The potential of mitochondrial membrane was evaluated by following the protocol
238 described by Garner and Johnson (1995). The samples were incubated with JC-1
239 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (final
240 concentration: 0.3 μ M) for 30 min in darkness at 38 °C. Two different emission filters
241 (FL-1 and FL-2) were used to differentiate two sperm populations: (i) spermatozoa with
242 high MMP (JC-1 aggregates), and (ii) spermatozoa with low MMP (JC-1 monomers;
243 Gillan et al., 2005). The percentage of spermatozoa with high MMP corresponded to the
244 orange-stained spermatozoa, which appeared in the upper half of the diagram in FL1 vs.
245 FL2 dot-plots. Data were not compensated.

246

247 **2.11 Protein extraction and quantification**

248

249 Seminal doses were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) solution by
250 centrifuging at 600 Gs for 10 min to remove any traces of semen extender. Supernatants

251 were carefully discarded and the resultant pellets were stored at -80 °C until protein
252 extraction. For protein extraction, pellets were subsequently re-suspended in 400mL ice-
253 cold lysis buffer and sonicated thoroughly (50% amplitude, which corresponded to 10
254 kHz and at least 20 long-lasting pulses; Bandelin Sonopuls HD 2070; Bandelin Electronic
255 GmbH and Co., Berlin, Germany). To avoid the specimen heating, samples were kept on
256 ice while sonicating. This lysis buffer consisted of 1% (v:v) Triton X-100 lysis buffer
257 with 150mM NaCl, 50mM Tris Cl (pH 8.8), 2% (v/v) sodium dodecyl sulfate (SDS;
258 Serva), 8M urea, 2mM DL-Dithiothreitol, 0,5% (v/v) tween-20, 1mM of
259 phenylmethanesulfonyl fluoride, 1mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride,
260 and a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) at 1:100 (v:v). After this proceeding,
261 samples were kept on ice for a 30 min and then centrifuged at 10000 Gs and 4 °C for 15
262 min. The supernatant was carefully collected and quantified by detergent compatible
263 Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). The sample
264 quantification of the total protein content was repeated three times and stored at until -80
265 °C used.

266

267 **2.11.1 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–page) and** 268 **Western Blot analysis**

269

270 For SDS–PAGE separation, 10 mg of each protein sample were diluted 1:2 in 2X
271 Laemmli reducing buffer with 5% (v:v) b-mercaptoethanol (Bio-Rad Laboratories, Inc.).
272 Sample and the molecular-weight marker (All Blue Precision Plus Protein Standards;
273 BioRad) were boiled for 5 minutes at 90 °C, were loaded on 1 mm SDS–PAGE gels. The
274 separating gel contained 12% acrylamide, whereas the stacking one contained 5% (v:v)
275 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Subsequently gel electrophoresis was run at constant

276 voltage (80 V for stacking gels and 120 V for separating gels); proteins were transferred to
277 polyvinylidene fluoride membrane (Immobilon-P; Millipore, Darmstadt, Germany) for 2
278 hours at 120 mA. After membranes were blocked with blocking solution, consisting of
279 with 5% BSA (v/v) in TBST at 4° C overnight with agitation.

280 Membranes were incubated with a primary anti-phospho-GSK3 (Tyr279/Tyr216)
281 antibody (clone 5G-2F, 05-413, Millipore) diluted in the blocking solution 1:1000 (v/v)
282 at agitation for 1 hour at room temperature. After washing the membranes four times for
283 5 minutes each in TBST, they were incubated a secondary with a horseradish peroxidase
284 (HRP) - conjugated polyclonal anti-mouse antibody (P0260; Dako Denmark A/S,
285 Glostrup, Denmark) diluted 1:5000 in blocking solution (v:v) at room temperature with
286 agitation for 1 hour, next membranes were washed eight times for 5 minutes each in
287 TBST.

288 Reactive bands were visualized with a chemiluminescent substrate (Immobilon Western
289 Chemiluminescent HRP Substrate; Millipore) and scanned using G:BOX Chemi XL 1.4
290 (SynGene, Frederick, MT, USA) and GeneSys image acquisition software v1.2.8.0
291 (SynGene). Protein bands from scanned images were semiquantified through Quantity
292 One v4.6.9 software package (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Protein quantification was
293 expressed as the total signal intensity inside the boundary of a band measured in pixel
294 intensity units (density, square millimeter) minus the background signal, considered as 0
295 (white).

296 To normalize blotted protein α -Tubulin was used content for each band after stripping–
297 reprobing membranes. Shortly, membranes were stripped under agitation for 10 minutes,
298 2 times at stripping buffer containing 0.02 M glycine, 0.0003 M SDS (Dodecil sulfato de
299 sódio) and 1% (v:v) Tween 20 (pH 2.2) in 100 ml Milli-Q water. After washed two times
300 for 10 min in TBS and two times for 5 min in TBST. After washing stripped membranes

301 were subsequently incubated with an anti- α -tubulin mouse antibody (anti- α -tubulin
302 antibody clone DM1A, MABT205; Millipore) diluted 1:5,000 in blocking solution (v:v)
303 for 1 hour at room temperature and under agitation. And then with a HRP-conjugated
304 polyclonal antimouse antibody (P0260; Dako Denmark A/S) diluted 1:15,000 in blocking
305 solution (v:v) at the same conditions. Reactive bands were visualized as previously
306 described. GSK3 was normalized by determining the following ratio:

307 Protein content = band of interest (intensity) / α -tubulin band (intensity).

308

309 **2.11.2 DARPP32-PKA**

310

311 Samples were loaded onto 10% (w:v) acrylamide gels to perform SDS-PAGE (Laemmli,
312 1970). Pre-stained protein standards with a molecular mass range of approximately
313 250kDa to 10kDa were added to another lane. Separated proteins were transferred onto a
314 low-fluorescence polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad) using the Trans-
315 Blot[®] Turbo Transfer System (Bio-Rad). Membranes were subsequently immersed in
316 blocking solution for 60 min; blocking solution consisted of a Tris-buffered saline
317 solution added with 5% (w:v) BSA and 0.1% (v:v) Tween-20. Subsequently, membranes
318 were submerged in blocking solution containing the appropriate concentration of the
319 primary antibody. Membranes were incubated with the antibody at 4°C for 8h. Primary
320 antibody was an anti-phospho DARPP-32 (Thr 75) (Cell Signaling Technology; Leyden;
321 The Netherlands). The dilution factor was 1:1,000 (v:v). After three washes, membranes
322 were incubated with a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated donkey anti-rabbit
323 secondary antibody (Dako; Glostrup, Denmark) at a dilution of 1:5,000 (v:v) in blocking
324 solution for 60 min. Membranes were washed six times and were revealed using a
325 chemiluminescent HRP substrate (ImmunoCruz Western Blotting Luminol Reagent;

326 Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Afterwards, an anti-PKA α primary
327 antibody (Cell Signaling Technology) was used as an internal standard to normalise the
328 volume of protein bands, after stripping and reprobing at a final dilution of 1:1,000 (v:v).
329 Likewise with the DARPP-32, the secondary antibody for the anti-PKA α antibody was a
330 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated donkey anti-rabbit secondary antibody (Dako;
331 Glostrup, Denmark) at a dilution of 1:5,000 (v:v).
332 Analysis of membrane images was performed with ImageJ 1.49 (National Institute of
333 Health, USA) software. The intensity of each band was quantified and the background,
334 defined as the surrounding area of the band with a width of 1 mm, was utilized to adjust
335 the value of intensity of each band. Ratios between the intensity values of DARPP32 and
336 their corresponding PKA bands were calculated using the following formula: (P-BP)/(T-
337 BT), where P was the intensity value in arbitrary units obtained from the DARPP32 band,
338 BP was the intensity of the background of the DARPP32 band, T was the intensity of the
339 PKA band, and BT was the intensity of the background of the PKA band. Data were
340 corrected to a basal arbitrary value of 100 for the control point, which corresponded to
341 the incubation in standard CM at 0h.

342

343 **2.12 Statistical analyses**

344

345 Data analyses were performed using a statistical package (IBM SPSS for Windows, 25.0;
346 Armonk, NY, USA). Data were first checked for normal distribution (Shapiro-Wilk) and
347 homogeneity of variances (Levene test) prior to running a mixed model with the treatment
348 (eight treatments) being considered as the inter-subjects factor and the incubation time
349 the intra-subjects factor. Post-hoc Sidak's test was run for pair-wise comparisons, and the
350 level of significance was set at $P \leq 0.05$.

351 **3 Results**

352 **3.1 Effects of different BSA and Bicarbonate concentrations on plasma membrane** 353 **integrity**

354

355 Plasma membrane integrity during IVC was evaluated through SYBR-14/PI. The effects
356 of the different capacitation mediums in the viable spermatozoa during IVC, are presented
357 in the Figure 1. Harmful effects were observed in treatments containing 38mM of
358 bicarbonate, with or without addition of BSA evident 120 min, after the beginning of the
359 IVC procedure. At this moment, mediums without bicarbonate (with or without addition
360 of BSA) presented a significantly higher percentage ($P < 0.05$) of viable spermatozoa than
361 BSA + Bic 5mM medium. This trend was maintained after 240 min of IVC; however, at
362 300 min of incubation, the medium No BSA / No Bic had a significantly higher
363 percentage ($P < 0.05$) of viable spermatozoa.

364

365 **3.2 Effects of different BSA and Bicarbonate concentrations on acrosome integrity**

366

367 Acrosome integrity during IVC was evaluated through PNA-FITC/PI. Figure 2 shows the
368 effects that different capacitation medium on the percentage of acrosome integrity. The
369 percentages of spermatozoa with an intact acrosome (PNA-FITC/PI) were significantly
370 higher ($P < 0.05$) in the mediums without bicarbonate (with or without addition of BSA)
371 than another treatments after 120 min of incubation. At 240 min, the mediums without
372 bicarbonate (with or without addition of BSA) and BSA + 5 mM Bic were the medium
373 that presented the best results of acrosome integrity. The medium BSA + 38 mM Bic was
374 the media that presented the biggest percentage of PNA-FITC + / PI + from 0 min to 300
375 min of incubation.

376 **3.3 Effects of different BSA and Bicarbonate concentrations on membrane lipid**
377 **disorder**

378

379 The effect of different capacitation media on the percentage of viable spermatozoa with
380 low lipid membrane disorder is shown in Figure 3, this parameter was assessed by M-540
381 and YP1 staining during IVC. Similarly, to spermatozoa viability, its effects were time
382 and concentration of bicarbonate in medium. After 120 min of IVC, the percentage of
383 viable spermatozoa with low lipid change in the membrane, was significantly lower (P
384 <0.05) in the treatments without bicarbonate (with or without addition of BSA) when
385 compared to the 5mM bicarbonate treatment (with or without BSA and bicarbonate) and
386 15mM bicarbonate (with or without BSA and bicarbonate). The treatment No BSA + 38
387 mM Bic, was significantly ($P <0.05$) different from the other treatments. This trend was
388 maintained after 240 min of IVC. However, at 300 min of incubation the medium No
389 BSA / No Bic was significantly different ($P <0.05$) showing viable sperm with low lipid
390 membrane disorder, followed by the medium BSA / No Bic, and in the other mediums
391 the disorder lipid profile of the membrane was increased according to the concentration
392 of bicarbonate.

393

394 **3.4 Effects of different BSA and Bicarbonate concentrations on mitochondrial**
395 **membrane potential**

396

397 The effect of different capacitation media on mitochondrial membrane potential is shown
398 in Figure 4A. Incubation of boar sperm BSA + 38 mM Bic significantly ($P <0.05$)
399 increased the percentage of spermatozoa with high mitochondrial membrane potential
400 (MMP) following the JC-1 staining method from 0 min to 300 min of incubation. The

401 addition of progesterone after 4h of incubation induced a very rapid increase in this
402 percentage. Subsequently, there was a rapid decrease in the percentage of sperm with high
403 MMP that was maintained until the end of the experimental period.

404 Sperm incubation in media No BSA / No Bic prevented the increase of the percentage of
405 spermatozoa with high MMP from 0 at 260 min. However, the addition of progesterone
406 in this medium after 240 min of incubation also augmented the percentage of spermatozoa
407 with high MMP. At 270 min, it was observed the same values for the medium No BSA /
408 No Bic and the medium BSA + 38 mM Bic. Afterwards, at 300 min this mediums have
409 different percentage of spermatozoa with high MMP, being the medium BSA + 38 mM
410 Bic bigger percentage of spermatozoa with MMP significant ($P<0.05$).

411 Besides that, the addition of progesterone into media BSA + 15 mM Bic at 240 min of
412 incubation also augmented the percentage of spermatozoa with high MMP. However, the
413 extent of that increase was significantly ($P<0.05$) lower than that observed in BSA + 38
414 mM Bic. Afterwards, the percentage of spermatozoa with high MMP rapidly decreased,
415 reaching similar values to those observed before the progesterone addition. The other
416 mediums had values significant inferior ($P<0.05$).

417

418 Figure 4B shows the FL2:FL1 ratio in the sperm population with high mitochondrial
419 membrane potential (JC-1agg). Values significantly ($P<0.05$) higher were observed for
420 mediums BSA + 15 mM Bic, No BSA + 5 mM Bic and BSA + 5 mM Bic for 0 at 240
421 min. Subsequent the addition of progesterone to medias, only the mediums with BSA +
422 15 mM Bic, No BSA + 5 mM Bic showed a significantly ($P<0.05$) higher FL2:FL1 ratio
423 in the sperm population with high membrane potential than others mediums. At 270 min,
424 the mediums BSA + 15 mM Bic, No BSA + 5 mM Bic, BSA + 5 mM Bic, BSA + No Bic

425 and No BSA +No Bic presented higher FL2:FL1 ratio in the sperm population with high
426 mitochondrial membrane potential.

427

428 **3.5 Effects of different BSA and Bicarbonate concentrations on Fluo3-marked**
429 **intracellular Ca²⁺**

430

431 Figure 5 shows the percentage of viable spermatozoa with high intracellular calcium
432 levels (Fluo3⁺ /PI⁻ spermatozoa). High levels of intracellular calcium, was observed at
433 media BSA + 38 mM BIC from 0 to 300 min and the maximum values of this parameter
434 were observed after 240 min of incubation. Followed by media BSA +15 mM BIC from
435 0 to 300 min of incubation. After the addition of progesterone (240 min) the mediums
436 BSA + 5 mM Bic and BSA + No Bic had the same calcium level. The medium No BSA
437 + 5mM Bic presented low intracellular calcium from 0 at 300 min of incubation.

438

439 **3.6 Effects of different BSA and Bicarbonate concentrations on Rhod-5N-marked**
440 **intracellular Ca²⁺**

441

442 In a similar way to that observed for the Fluo-3 signal, the percentage of viable cells with
443 a positive Rhod-5N signal progressively increased when sperm was incubated in media
444 BSA + 38 mM BIC and the addition of progesterone (240 min) induced a rapid increase
445 of this percentage. Followed by the media BSA + 15 mM Bic after the addition of
446 progesterone. After the addition of progesterone, the mediums with BSA + 5 mM Bic and
447 BSA / No Bic had the same effect. The medium with low intracellular calcium from 0 at
448 300 min of incubation was the media No BSA + 15 mM Bic.

449

450 **3.7 Effects of different BSA and Bicarbonate concentrations on motility**

451

452 The results obtained after assessing the different mediums on total motility of
453 spermatozoa along the incubation period and the achievement of in vitro capacitation, are
454 available in the Figure 7. The total motility of spermatozoa incubated in mediums with
455 BSA / No Bic and BSA + 5 mM Bic, expressed maximum percentages of total motility
456 and decreased throughout the experiment, reaching minimal values after 60 min of the
457 addition of progesterone. Incubation of spermatozoa in media without BSA + 38 mM Bic
458 had the worst total motility, with complete immobilization at the end of the experiment.

459

460 Another analysis performed was the progressively motility of spermatozoa Figure 8. The
461 results were analogous to those obtained for the total motility, likewise the medium BSA
462 + 5 mM Bic presented higher percentages of progressively motility, followed by the
463 medium BSA / No Bic and BSA/15mM Bic. The media with 38 mM of bicarbonate, with
464 or without BSA, had the worst values of progressively motility.

465

466 **3.8 Effects of different BSA and Bicarbonate concentrations on GSK3 α tyrosine** 467 **phosphorylation**

468

469 The incubation in media BSA + 38 mM Bic induces a progressive increasing in time-
470 dependent phosphorylation of GSK3 α tyrosine, reaching maximum values at 240 min of
471 incubation. In the other hand, results in medium containing BSA + 5 mM Bic
472 concentration were equal of the media BSA + 38 mM Bic at 300 min (Fig.9). The
473 subsequent addition of progesterone did not maintain that intensity at 300 min of
474 incubation in media BSA + 38 mM Bic, only in medium containing BSA + 5 mM.

475 However, the samples submitted to incubation in media BSA / No Bic did not show any
476 significant increase in phosphorylation after 240 min of incubation (Fig. 9).

477

478 **3.9 Effects of different BSA and Bicarbonate concentrations on DARPP/PKA** 479 **phosphorylation**

480

481 These results further indicated that high levels of DARPP-32/PKA phosphorylation were
482 reach in the media BSA / No Bic at the times 0h e 4h (Figure 10). After 5 min of addition
483 of progesterone and after 60 min the media BSA + 38 mM Bic was similar the media
484 BSA / No Bic. The smaller activity of DARPP-32 was founded at the media No BSA +
485 38 mM Bic.

486

487 **4 DISCUSSION**

488

489 Our results indicate that the presence of BSA is essential for capacitation of boar sperm
490 and that is the best-performing was the BSA + 15 mM Bic in agreement with Soriano-
491 Úbeda et al. (2019). Thus, in relation to IVC, it must be emphasized that the capacitation
492 status was reached without bicarbonate, in the presence of BSA. Although the degree of
493 capacitation in the medium without bicarbonate be lower than the medium with higher
494 concentration of bicarbonate, it is important to note that the spermatozoa was capacitated
495 without the presence of bicarbonate in the medium, since bicarbonate is a well known and
496 potent inducer in most of mammalian species, including swine (Boatman and Robins,
497 1991). Other authors have already performed studies including only BSA and calcium as
498 capacitation factors and have demonstrated that IVC can also be achieved in boar
499 spermatozoa in medium without bicarbonate (Ramió-Lluch et al., 2011; 2014; Yeste et

500 al., 2015; Ramió-Lluch et al., 2019), however these authors did not compare different
501 concentrations of bicarbonate in the capacitor medium. In the present work, the obtaining
502 of viable IVC in CM without bicarbonate is confirmed by the determination of sperm
503 viability, motility, phosphorylation of DARPP32 and GSK3 α parameters analysed by
504 cytometry, such as membrane changes and positive acquisition of IVAE after induction
505 of progesterone. Therefore, the present results suggest that, differently of other species
506 such as cattle, mice and humans, bicarbonate is not essential for the capacitation process
507 in boar sperm (Visconti et al., 1995; Smaili and Russell, 1999; Battisone et al., 2013).
508 Thus, in spite of the fact that the general molecular mechanisms for obtaining IVC would
509 be common among species, the specific importance of these mechanisms would change
510 depending of the specie. Our results suggest that, in boar spermatozoa, BSA would be
511 sufficient to initiate the entire succession of events that make IVC viable and other forms
512 in this species can mimic the events related to bicarbonate.

513 Focusing on bicarbonate, the results of this study have revealed some questions. First, in
514 relation to membrane integrity and lipid disorder, the capacitive media containing the
515 highest concentrations of bicarbonate (38mM and 15mM) had the lowest membrane
516 integrity and greater lipid disorder, this shows that the presence of bicarbonate was
517 important to generate the fluidity of membrane. This is due to the high levels of
518 intracellular bicarbonate that produces an asymmetry of the plasma membrane, activating
519 the scramblase enzymes that translocate the phospholipids of membrane, such as
520 phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine (Gadella and Harrison, 2000),
521 reducing membrane stability (Gadella and Harrison, 2002), and making the cholesterol
522 available to external receptors. The BSA can then remove cholesterol more easily, and
523 this leads to a rapid collapse of sperm asymmetry (Salicioni et al., 2007; Visconti 2009;
524 Leahy and Gadella, 2015).

525 Analysing the data of sperm motility we observed that the mediums BSA / Bic 5 or 15mM
526 have a better total and progressive motility. These results were accompanied by
527 significant changes in the sperm population with high mitochondrial membrane potential
528 (MMP). When IVC occurs, an increase in mitochondrial activity is expected since this
529 ion transport measurements reflects metabolic activity and mitochondrial membrane
530 integrity (Llera et al, 2013). In the present study, it was found that the high molecular
531 weight of mitochondrial membrane was correlated with sperm motility (Gallon et al.,
532 2006; Paoli et al., 2011; Wang et al., 2012). In addition, we observed a calcium peak
533 (Fluo3 +) immediately after the IVAE and this induces a parallel increase in the rate of
534 oxidative phosphorylation, which would be reflected by an increase in the percentage of
535 spermatozoa with high MMP (Yeste et al., 2015). Calcium is also a key regulator for the
536 hyperactivation of spermatozoa (Sanchez-Cardenas et al., 2018), being the
537 hyperactivation an essential step for the sperm fertilization capacity. An asymmetrical
538 and wide amplitude flagellar movement (Singh and Rajender, 2015) characterizes this
539 motile pattern. The highest concentration of bicarbonate (38 mM) had the lowest values
540 of motility, despite having a high calcium peak. These results were accompanied by
541 significant changes in percentages of viability and acrosome alterations, indicating that
542 these alterations in motility were not associated with other spermatic alterations. In fact,
543 our flow cytometry data suggest that the high concentration of bicarbonate causes
544 damages in sperm cells.

545 In relation to calcium, the tests with Fluo-3 and Rhod-5N mark the accumulation of
546 calcium from the extracellular environment to the calcium deposits, due to the induction
547 of IVAE by progesterone. The addition of actives progesterone calcium channels
548 (CatSper) and raises the level of calcium and the regulatory activities of influx required
549 for fertilization (Lishko et al., 2012; Brown et al., 2017). Previous research has shown

550 that, in boars, calcium has a central role during sperm capacitation and acrosome reaction
551 (Yeste et al., 2015, Gadella and Boerke, 2016). In this study, we observed that BSA was
552 essential for calcium peak after progesterone induction of IVAE, and the means without
553 BSA obtained the worst results. These data are in agreement with Espinosa (2000) where
554 these authors affirmed that the BSA of the capacitive medium is responsible for the entry
555 of calcium in the sperm cell. In addition, the peak was proportional to bicarbonate
556 concentration with the highest peaks being 38nM / 15nM / 5nM. In view of this, we can
557 say that BSA and bicarbonate acted synergistically for the entry of calcium into the sperm
558 cell. It is known that the BSA chemically inserted in the in vitro capacitation media
559 performs cholesterol extraction from the plasma membrane of the spermatozoon, leading
560 to a displacement of the phospholipids and a new rearrangement of its structure,
561 increasing the fluidity of the membrane (Boerke et al., 2014). The decrease of cholesterol
562 causes an increase in the membrane phospholipid disorder, which initiates a chain of
563 events such as the raising of calcium levels through the channels CatSper (Xia and Ren,
564 2009) and bicarbonate, in addition of the activation of cysteine adenylate and cAMP and
565 phosphorylation of specific proteins (Visconti, 2009).

566 In mammalian spermatozoa, the phosphorylation of membrane proteins, together with the
567 phosphorylation of the tyrosine residues of sperm proteins, is the central route of
568 activation of sperm capacitation (Visconti et al., 1998). In pigs, glycogen synthase kinase-
569 3 (GSK3) is present in sperm cells, and is phosphorylated to Ser21 and Ser9 in response
570 to activation of PKA (Aparicio et al., 2007; Llera et al., 2016). It is known that this protein
571 is related to the sperm motility (Aparicio et al., 2007; Bragado et al., 2010; Gong et al.,
572 2017), acrosome reaction (Reid et al., 2015) and fertilization capacity (Belenky and
573 Breitbart, 2017).

574 In the present work, we evaluated the phosphorylation of GSK3 α during sperm
575 capacitation and noted that there was an increase in GSK3 α tyrosine phosphorylation in
576 the capacitive medium, being that the non-capacitive medium (No BSA / No bicarbonate)
577 had the lowest phosphorylation rates. These findings were also found by other authors,
578 which when incubating the spermatozoa in capacitive medium, noted an increase in
579 tyrosine phosphorylation in the two isoforms of GSK3 and this increase was concomitant
580 with that of M540 + (data not yet published). The highest phosphorylation peak of GSK3 α
581 was in 38nM BSA / bicarbonate medium and this data coincides with lower motility.
582 These results are related to the findings of other authors, in which the GSK3 α isoform
583 played a negative role in the regulation of motility of swine (Aparicio et al., 2007) and
584 bovine spermatozoa (Vijayaraghavan et al., 1996). However, the 5nM / 15nM BSA /
585 bicarbonate media showed high levels of GSK3 α phosphorylation and motility, indicating
586 that there are more mechanisms involved in this process.

587 The DARPP-32 is regulated by a complex system of intracellular signaling pathways
588 involving cAMP and calcium. As DARPP-32 controls several kinases and phosphatases
589 involved in sperm capacitation, it has important implications as one of the first markers
590 of the capacitation process (Córdova et al., 2012). Our results showed that high levels of
591 DARPP-32 / PKA phosphorylation were reaching in the mean with BSA / No Bic at the
592 times 0h and 4h. After 60 min of the addition of progesterone, the mean with BSA /
593 38mM Bic was similar to the mean BSA / No Bic. The smaller activity of DARPP-32
594 phosphorylation was founded at the mean without BSA / 38mM Bic. Thus, we realized
595 that it was possible to reach the IVC without the use of bicarbonate, only with the addition
596 of the BSA in the capacitive medium, similar to the other analyzes performed in this
597 experiment. Regarding the effect of BSA on the induction of IVC, the privation of
598 extracellular BSA in the capacitive medium was concomitant with the inability of the

599 phosphorylated spermatozoa to DARPP32 and, finally, to achieve an adequate induction
600 to IVAE by progesterone. In fact, the feasible induction of IVAE by progesterone is the
601 most positive evidence, indicating the achievement of previous IVC, which is evident
602 when we compare the results obtained with those acquired in cells incubated in non-
603 capacitive media (No BSA / No Bic) where IVAE was not reached after progesterone
604 induction, as indicated by the phosphorylation of DARPP32. Although bicarbonate is a
605 potent boar sperm-enhancing factor, it is not an absolute requirement to reach IVC in this
606 species, in which BSA can act as the only enabling factor in our conditions.

607 In conclusion, our results indicate that BSA is a limiting factor in capacitive medium for
608 IVC in boar spermatozoa. The addition of bicarbonate in the capacitive medium is not a
609 limiting factor for the IVC. The capacitive medium containing BSA / 15mM bicarbonate
610 has the best capacitation performance, the cells have high levels of M540, calcium and
611 phosphorylation of proteins but do not die as fast as the medium containing 38mM of
612 bicarbonate.

613 **ACKNOWLEDGMENTS**

614 This research was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
615 Nível Superior (CAPES), Brazil (Grants: 88881.135379/2016-01) and Ministry of
616 Science, Innovation and Universities, Spain (Grants: RYC-2014-15581 and AGL2017-
617 88329-R).

618

619 **CONFLICT OF INTEREST**

620 The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as
621 prejudicing the impartiality of the research reported herein.

622

623 **AUTHORS' CONTRIBUTION**

624 B.R.C. conducted lab experiments. A.P.P.P. collaborated with B.R.C. in performing
625 laboratory work. B.R.C., J.E.R.G., S.G., M.Z. and M.Y. designed the study, analyzed the
626 data and critically revised the manuscript. BRC wrote the manuscript, under the critical
627 revision of the other authors.

628

629 **REFERENCES**

- 630 Aparicio, I. M., Bragado, M. J., Gil, M. C., Garcia-Herreros, M., Gonzalez-Fernandez,
631 L., Tapia, J. A., Garcia-Marin, L. J. (2007). Phosphatidylinositol 3-kinase
632 pathway regulates sperm viability but not capacitation on boar spermatozoa.
633 *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 74,
634 1035-1042.
- 635 Austin, C. (1951). Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg.
636 *Australian journal of biological sciences*, 4, 581-596.
- 637 Battistone, M. A., Da Ros, V. G., Salicioni, A. M., Navarrete, F. A., Krapf, D., Visconti,
638 P. E., Cuasnicu, P. S. (2013). Functional human sperm capacitation requires both
639 bicarbonate-dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr
640 phosphatases by Src family kinases. *MHR: Basic science of reproductive
641 medicine*, 19, 570-580.
- 642 Belenky, M., Breitbart, H. (2017). Role and regulation of Glycogen synthase kinase-3
643 beta in bovine spermatozoa. *Molecular reproduction and development*, 84, 8-18.
- 644 Betarelli, R. P., Rocco, M., Yeste, M., Fernández-Novell, J. M., Placci, A., Azevedo
645 Pereira, B., Castillo-Martín M., Estrada, E., Penã, A., Zangeronimo M. G.,
646 Rodríguez-Gil, J. E. (2018). The achievement of boar sperm in vitro capacitation
647 is related to an increase of disrupted disulphide bonds and intracellular reactive
648 oxygen species levels. *Andrology*, 6, 781-797.
- 649 Boatman, D. E., Robbins, R. S. (1991). Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm
650 capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. *Biology of
651 reproduction*, 44, 806-813.
- 652 Boerke, A., van der Lit, J., Lolicato, F., Stout, T. A., Helms, J. B., Gadella, B. M. (2014).
653 Removal of GPI-anchored membrane proteins causes clustering of lipid
654 microdomains in the apical head area of porcine sperm. *Theriogenology*, 81, 613-
655 624.
- 656 Bragado, M. J., Aparicio, I. M., Gil, M. C., Garcia-Marin, L. J. (2010). Protein kinases A
657 and C and phosphatidylinositol 3 kinase regulate glycogen synthase kinase-3A
658 serine 21 phosphorylation in boar spermatozoa. *Journal of cellular biochemistry*,
659 109, 65-73.
- 660 Brown, S. G., Costello, S., Kelly, M. C., Ramalingam, M., Drew, E., Publicover, S. J.,
661 Barratt, C. L. R., Da Silva, S. M. (2017). Complex CatSper-dependent and
662 independent [Ca²⁺]_i signalling in human spermatozoa induced by follicular fluid.
663 *Human Reproduction*, 32, 1995-2006.
- 664 Buffone, M. G., Wertheimer, E. V., Visconti, P. E., Krapf, D. (2014). Central role of
665 soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. *Biochimica Et
666 Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842, 2610-2620.
- 667 Chang, M. C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian
668 tubes. *Nature*, 168, 697.

- 669 Córdova, A., Strobel, P., Ulloa, O., Urra, J., Contreras, C., Valenzuela, P., Carrillo, A.,
670 Burgos, R., Menarim, B., Ratto, M., Joan, E. R. G., Ramírez, A. (2012). 40.
671 Development of stallion sperm cryopreservation extenders by analysis of semen
672 quality and new cryocapacitation markers. *Cryobiology*, 65, 352.
- 673 Espinosa, F., López-González, I., Muñoz-Garay, C., Felix, R., De la Vega-Beltrán, J. L.,
674 Kopf, G. S., Visconti, P. E., Darszon, A. (2000). Dual regulation of the T-type
675 Ca²⁺ current by serum albumin and β -estradiol in mammalian spermatogenic
676 cells. *FEBS letters*, 475, 251-256.
- 677 Fàbrega, A., Puigmulé, M., Yeste, M., Casas, I., Bonet, S., Pinart, E. (2011). Impact of
678 epididymal maturation, ejaculation and in vitro capacitation on tyrosine
679 phosphorylation patterns exhibited of boar (*Sus domesticus*) spermatozoa.
680 *Theriogenology*, 76, 1356-1366.
- 681 Gadella, B. M., Harrison, R. A. (2000). The capacitating agent bicarbonate induces
682 protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the
683 sperm plasma membrane. *Development*, 127, 2407-2420.
- 684 Gadella, B. M., Harrison, R. A. P. (2002). Capacitation induces cyclic adenosine 3', 5'-
685 monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of
686 aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells.
687 *Biology of reproduction*, 67, 340-350.
- 688 Gadella, B. M., Van Gestel, R. A. (2004). Bicarbonate and its role in mammalian sperm
689 function. *Animal reproduction science*, 82, 307-319.
- 690 Gadella, B. M., Boerke, A. (2016). An update on post-ejaculatory remodeling of the
691 sperm surface before mammalian fertilization. *Theriogenology*, 85, 113-124.
- 692 Gallon, F., Marchetti, C., Jouy, N., Marchetti, P. (2006). The functionality of
693 mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing
694 capability. *Fertility and sterility*, 86, 1526-1530
- 695 Gangwar, D. K., Atreja, S. K. (2015). Signalling events and associated pathways related
696 to the mammalian sperm capacitation. *Reproduction in domestic animals*, 50, 705-
697 711.
- 698 Garner, D. L., Johnson, L. A. (1995). Viability assessment of mammalian sperm using
699 SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of reproduction*, 53, 276-284.
- 700 Gervasi, M. G., Visconti, P. E. (2016). Chang's meaning of capacitation: A molecular
701 perspective. *Molecular reproduction and development*, 83, 860-874.
- 702 Gong, Y., Guo, H., Zhang, Z., Zhou, H., Zhao, R., He, B. (2017). Heat Stress Reduces
703 Sperm Motility via Activation of Glycogen Synthase Kinase-3 α and Inhibition of
704 Mitochondrial Protein Import. *Frontiers in physiology*, 8, 718.
- 705 Harrison, R. A. P., Mairer, B., Miller, N. G. A. (1993). Flow cytometric studies of
706 bicarbonate-mediated Ca²⁺ influx in boar sperm populations. *Molecular
707 reproduction and development*, 35, 197-208.
- 708 Harrison, R. A. P., Ashworth, P. J. C., Miller, N. G. A. (1996). Bicarbonate/CO₂, an
709 effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid
710 architecture of boar sperm plasma membranes. *Molecular Reproduction and
711 Development: Incorporating Gamete Research*, 45, 378-391.

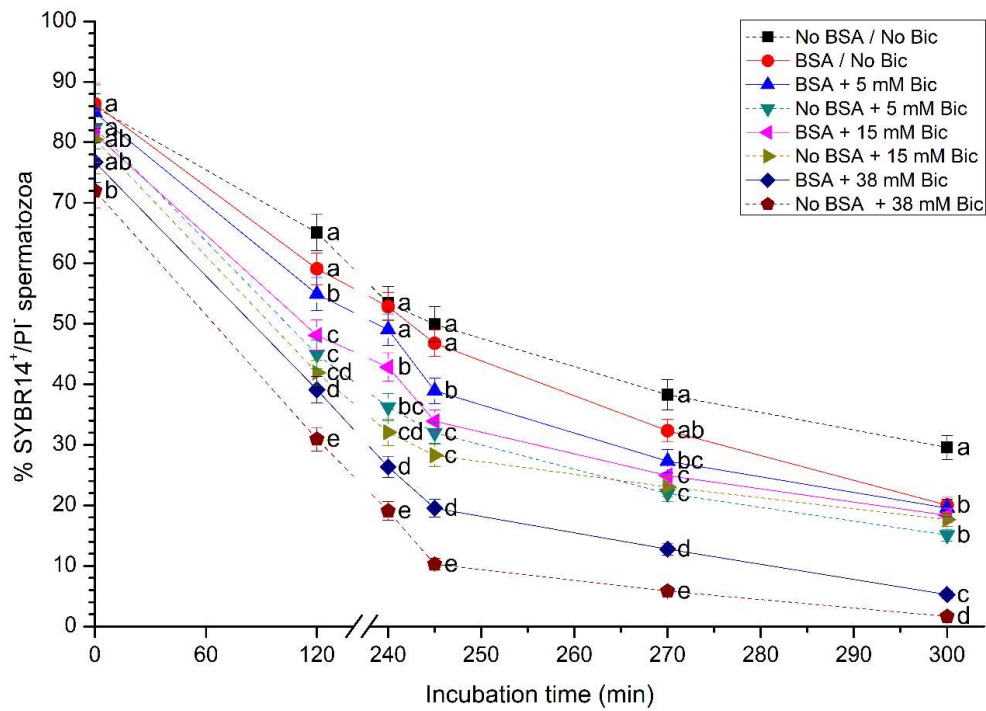
- 712 Llera, A. H., Martin-Hidalgo, D., Rodriguez-Gil, J. E., Gil, M. C., Garcia-Marin, L. J.,
713 Bragado, M. J. (2013). AMP-activated kinase, AMPK, is involved in the
714 maintenance of plasma membrane organization in boar spermatozoa. *Biochimica*
715 *et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828, 2143-2151.
- 716 Llera, A. H., Martin-Hidalgo, D., Gil, M. C., Garcia-Marin, L. J., Bragado, M. J. (2016).
717 New insights into transduction pathways that regulate boar sperm function.
718 *Theriogenology*, 85, 12-20.
- 719 K adirvel, G., Kumar, S., Kumaresan, A., Kathiravan, P. (2009). Capacitation status of
720 fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa in relation to cholesterol level,
721 membrane fluidity and intracellular calcium. *Animal reproduction science*, 116,
722 244-253.
- 723 Jiménez, I., González-Márquez, H., Ortiz, R., Herrera, J. A., García, A., Betancourt, M.,
724 Fierro, R. (2003). Changes in the distribution of lectin receptors during
725 capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology*, 59,
726 1171-1180.
- 727 Leahy, T., Gadella, B. M. (2015). New insights into the regulation of cholesterol efflux
728 from the sperm membrane. *Asian journal of andrology*, 17, 561.
- 729 Lishko, P. V., Kirichok, Y., Ren, D., Navarro, B., Chung, J. J., Clapham, D. E. (2012).
730 The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annual review of*
731 *physiology*, 74, 453-475.
- 732 Nagy, S., Jansen, J., Topper, E. K., Gadella, B. M. (2003). A triple-stain flow cytometric
733 method to assess plasma-and acrosome-membrane integrity of cryopreserved
734 bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles.
735 *Biology of reproduction*, 68, 1828-1835.
- 736 Naz, R. K., Rajesh, P. B. (2004). Role of tyrosine phosphorylation in sperm
737 capacitation/acrosome reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2, 75.
- 738 Paoli, D., Gallo, M., Rizzo, F., Baldi, E., Francavilla, S., Lenzi, A., Lombardo, F. M. D.,
739 Gandini, L. (2011). Mitochondrial membrane potential profile and its correlation
740 with increasing sperm motility. *Fertility and sterility*, 95, 2315-2319.
- 741 Puigmulé, M., Fàbrega, A., Yeste, M., Bonet, S., Pinart, E. (2011). Study of the
742 proacrosin-acrosin system in epididymal, ejaculated and in vitro capacitated boar
743 spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 23, 837-845.
- 744 Ramió, L., Rivera, M. M., Ramírez, A., Concha, I. I., Peña, A., Rigau, T., Rodríguez-Gil,
745 J. E. (2008). Dynamics of motile-sperm subpopulation structure in boar ejaculates
746 subjected to “in vitro” capacitation and further “in vitro” acrosome reaction.
747 *Theriogenology*, 69, 501-512.
- 748 Ramió-Lluch, L., Fernández-Novell, J. M., Peña, A., Colás, C., Cebrián-Pérez, J. A.,
749 Muiño-Blanco, T., Ramírez, A., Concha, I. I., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J. E.
750 (2011). ‘In vitro’ capacitation and acrosome reaction are concomitant with specific
751 changes in mitochondrial activity in boar sperm: evidence for a nucleated
752 mitochondrial activation and for the existence of a capacitation-sensitive
753 subpopulational structure. *Reproduction in domestic animals*, 46, 664-673.
- 754 Ramió-Lluch, L., Yeste, M., Fernández-Novell, J. M., Estrada, E., Rocha, L., Cebrián-
755 Pérez, J. A., Muiño-Blanco T., Concha, I. I., Ramírez, A., Rodríguez-Gil, J. E.

- 756 (2014). Oligomycin A-induced inhibition of mitochondrial ATP-synthase activity
757 suppresses boar sperm motility and in vitro capacitation achievement without
758 modifying overall sperm energy levels. *Reproduction, Fertility and Development*,
759 26, 883-897.
- 760 Ramió-Lluch, L., Blanco Prieto, O., Ramírez, A., Fernández-Novell, J. M., Peña, A., &
761 Rodríguez-Gil, J. E. (2019). "In vitro" capacitation and further progesterone-
762 induced acrosome exocytosis are linked to specific changes in the expression and
763 location of threonine phosphorylation of boar spermatozoa. *Reproduction in*
764 *Domestic Animals*.
- 765 Reid, A. T., Anderson, A. L., Roman, S. D., McLaughlin, E. A., McCluskey, A.,
766 Robinson, P. J., Aitken, R. J., Nixon, B. (2015). Glycogen synthase kinase 3
767 regulates acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa via dynamin
768 phosphorylation. *The FASEB Journal*, 29, 2872-2882.
- 769 Rocco, M., Betarelli, R., Placci, A., Fernández-Novell, J. M., Spinaci, M., Casao, A.,
770 Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J. A., Peña A., Rigau, T., Bonet, S., Castillo-
771 Martín, M., Yeste, M., Rodríguez-Gil, J. E. (2018). Melatonin affects the motility
772 and adhesiveness of in vitro capacitated boar spermatozoa via a mechanism that
773 does not depend on intracellular ROS levels. *Andrology*, 6, 720-736.
- 774 Rodríguez-Martinez, H., Ekstedt, E., Einarsson, S. (1990). Acidification of epididymal
775 fluid in the boar. *International journal of andrology*, 13, 238-243.
- 776 Rodríguez-Martinez, H., Tienthai, P., Suzuki, K., Funahashi, H., Ekwall, H.,
777 Johannisson, A. (2001). Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte
778 development in pigs. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-SUPPLEMENT-*, 129-
779 145.
- 780 Rodríguez-Martinez, H. (2007). Role of the oviduct in sperm capacitation.
781 *Theriogenology*, 68, S138-S146.
- 782 Salicioni, A. M., Platt, M. D., Wertheimer, E. V., Arcelay, E., Allaire, A., Sosnik, J.,
783 Visconti, P. E. (2007). Signalling pathways involved in sperm capacitation.
784 *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 65, 245.
- 785 Soriano-Úbeda, C., Romero-Aguirregomezcorta, J., Matás, C., Visconti, P. E., García-
786 Vázquez, F. A. (2019). Manipulation of bicarbonate concentration in sperm
787 capacitation media improves in vitro fertilisation output in porcine species. *Journal*
788 *of animal science and biotechnology*, 10, 19.
- 789 Tardif, S., Dubé, C., Chevalier, S., Bailey, J. L. (2001). Capacitation is associated with
790 tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins.
791 *Biology of reproduction*, 65, 784-792.
- 792 Tardif, S., Lefièvre, L., Gagnon, C., Bailey, J. L. (2004). Implication of cAMP during
793 porcine sperm capacitation and protein tyrosine phosphorylation. *Molecular*
794 *Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 69, 428-435.
- 795 Salicioni, A. M., Platt, M. D., Wertheimer, E. V., Arcelay, E., Allaire, A., Sosnik, J.,
796 Visconti, P. E. (2007). Signalling pathways involved in sperm capacitation.
797 *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 65, 245.

- 798 Sánchez-Cárdenas, C., Montoya, F., Navarrete, F. A., Hernández-Cruz, A., Corkidi, G.,
799 Visconti, P. E., Darszon, A. (2018). Intracellular Ca²⁺ threshold reversibly
800 switches flagellar beat off and on. *Biology of reproduction*, 99, 1010-1021.
- 801 Singh, A. P., Rajender, S. (2015). CatSper channel, sperm function and male fertility.
802 *Reproductive biomedicine online*, 30, 28-38.
- 803 Smaili, S. S., Russell, J. T. (1999). Permeability transition pore regulates both
804 mitochondrial membrane potential and agonist-evoked Ca²⁺ signals in
805 oligodendrocyte progenitors. *Cell calcium*, 26, 121-130.
- 806 Stival, C., Molina, L. D. C. P., Paudel, B., Buffone, M. G., Visconti, P. E., Krapf, D.
807 (2016). Sperm capacitation and acrosome reaction in mammalian sperm. In *Sperm*
808 *Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization* (pp. 93-106). Springer,
809 Cham.
- 810 Vijayaraghavan, S., Stephens, D. T., Trautman, K., Smith, G. D., Khatra, B., da Cruz e
811 Silva, E. F., Greengard, P. (1996). Sperm motility development in the epididymis
812 is associated with decreased glycogen synthase kinase-3 and protein phosphatase
813 1 activity. *Biology of reproduction*, 54, 709-718.
- 814 Visconti, P. E., Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D., Olds-Clarke, P., Kopf, G. S. (1995).
815 Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state
816 and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, 121, 1129-1137.
- 817 Visconti, P. E. (2009). Understanding the molecular basis of sperm capacitation through
818 kinase design. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 667-668.
- 819 Visconti, P. E., Kopf, G. S. (1998). Regulation of protein phosphorylation during sperm
820 capacitation. *Biology of reproduction*, 59, 1-6.
- 821 Wang, M. J., Ou, J. X., Chen, G. W., Wu, J. P., Shi, H. J., O, W. S., Martin-DeLeon P.
822 A., Chen, H. (2012). Does prohibitin expression regulate sperm mitochondrial
823 membrane potential, sperm motility, and male fertility?. *Antioxid Redox Signal*
824 17, 513–519.
- 825 Xia, J., Ren, D. (2009). The BSA-induced Ca (2+) influx during sperm capacitation is
826 CATSPER channel-dependent. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7, 119.
- 827 Yeste, M. (2013). Boar spermatozoa within the oviductal environment (II): Sperm
828 capacitation. In *Boar Reproduction* (pp. 347-405). Springer, Berlin, Heidelberg.
- 829 Yeste, M., Fernández-Novell, J. M., Ramió-Lluch, L., Estrada, E., Rocha, L. G., Cebrián-
830 Pérez, J. A., Muiño-Blanco, T., Concha, I. I., Ramírez, A., Rodríguez-Gil, J. E.
831 (2015). Intracellular calcium movements of boar spermatozoa during ‘in
832 vitro’capacitation and subsequent acrosome exocytosis follow a multiple-storage
833 place, extracellular calcium-dependent model. *Andrology*, 3, 729-747.
- 834

835 **Figures**

836



837

838 **Fig.1** Percentages of plasma membrane integrity of boar spermatozoa subjected to in vitro
 839 capacitation and subsequent in vitro acrosome exocytosis in different capacitation mediums.
 840 Different letters mean significant ($P < 0.05$) differences between treatments at a given time point.

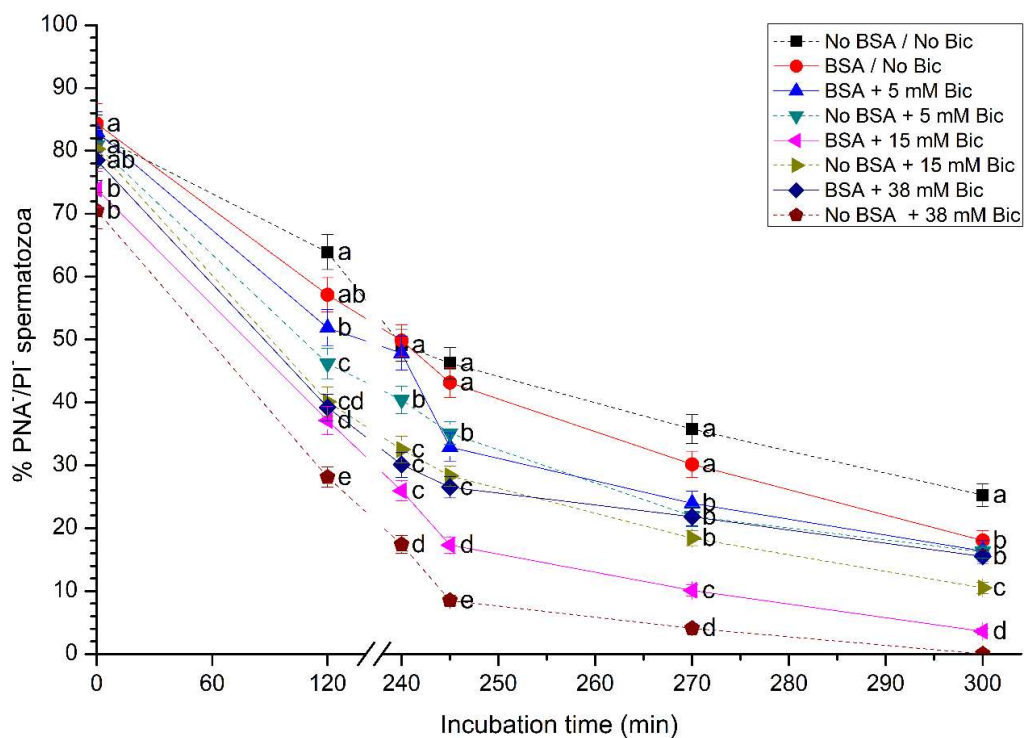
841

842

843

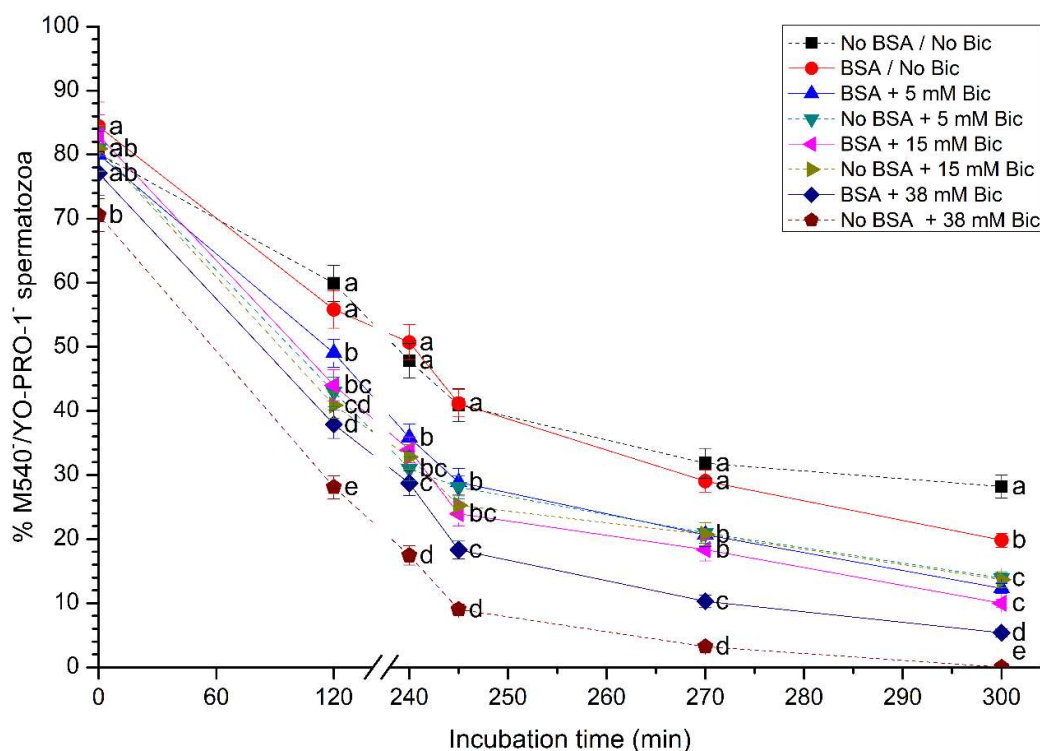
844

845



846

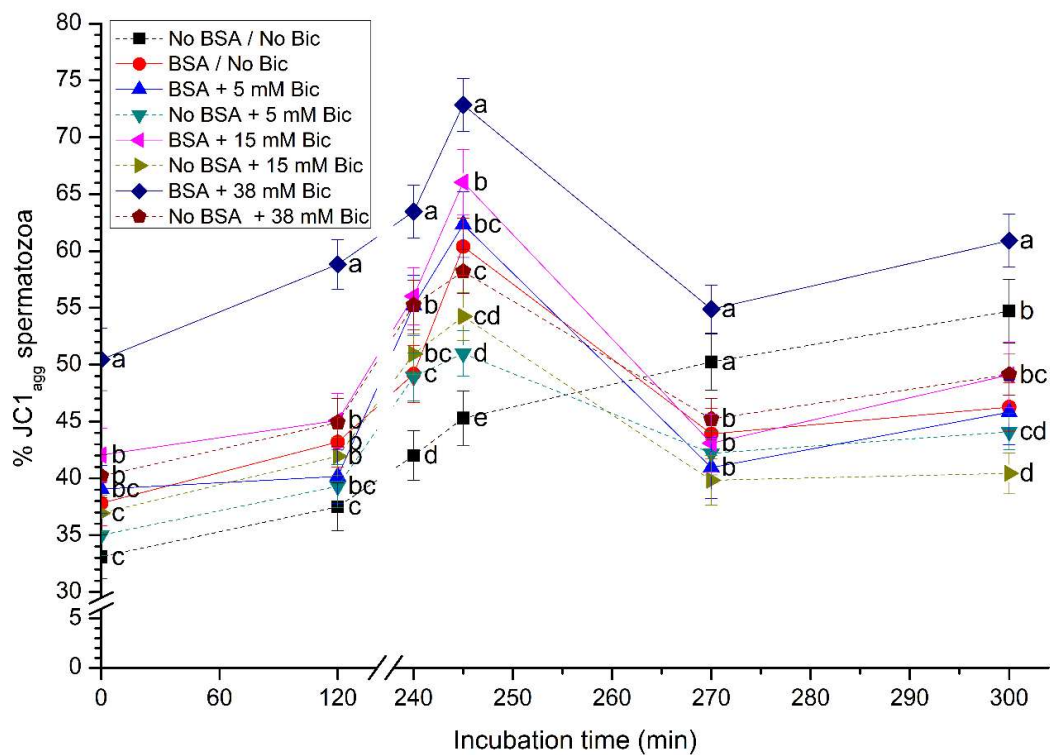
847 **Fig 2.** Percentages of acrosome integrity of boar spermatozoa subjected to in vitro
 848 capacitation and subsequent in vitro acrosome exocytosis in different capacitation mediums.
 849 Different letters mean significant ($P < 0.05$) differences between treatments at a given time point.



850

851 **Fig 3.** Percentages of membrane lipid disorder of boar spermatozoa subjected to in vitro
 852 capacitation and subsequent in vitro acrosome exocytosis in different capacitation mediums.
 853 Different letters mean significant ($P < 0.05$) differences between treatments at a given time point.

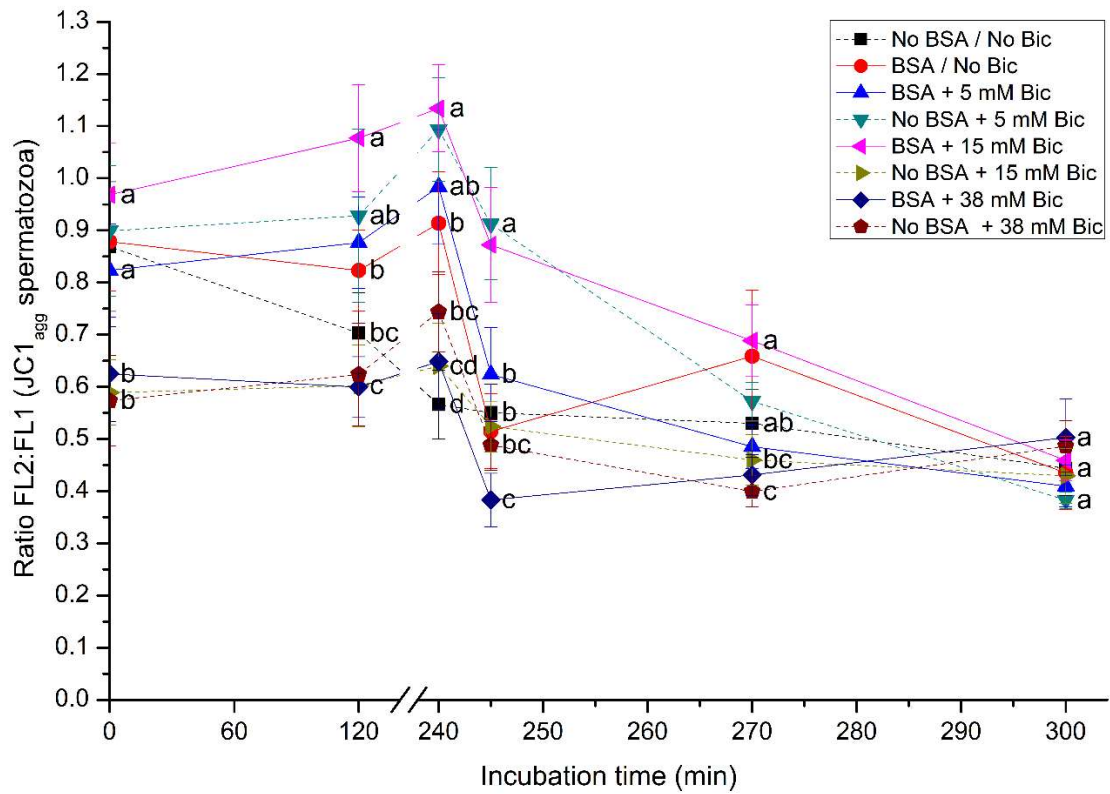
854



855

856 **Fig 4A.** Percentages of mitochondrial membrane potential of boar spermatozoa subjected to in
 857 vitro capacitation and subsequent in vitro acrosome exocytosis in different capacitation
 858 mediums. Different letters mean significant ($P < 0.05$) differences between treatments at a given
 859 time point.

860

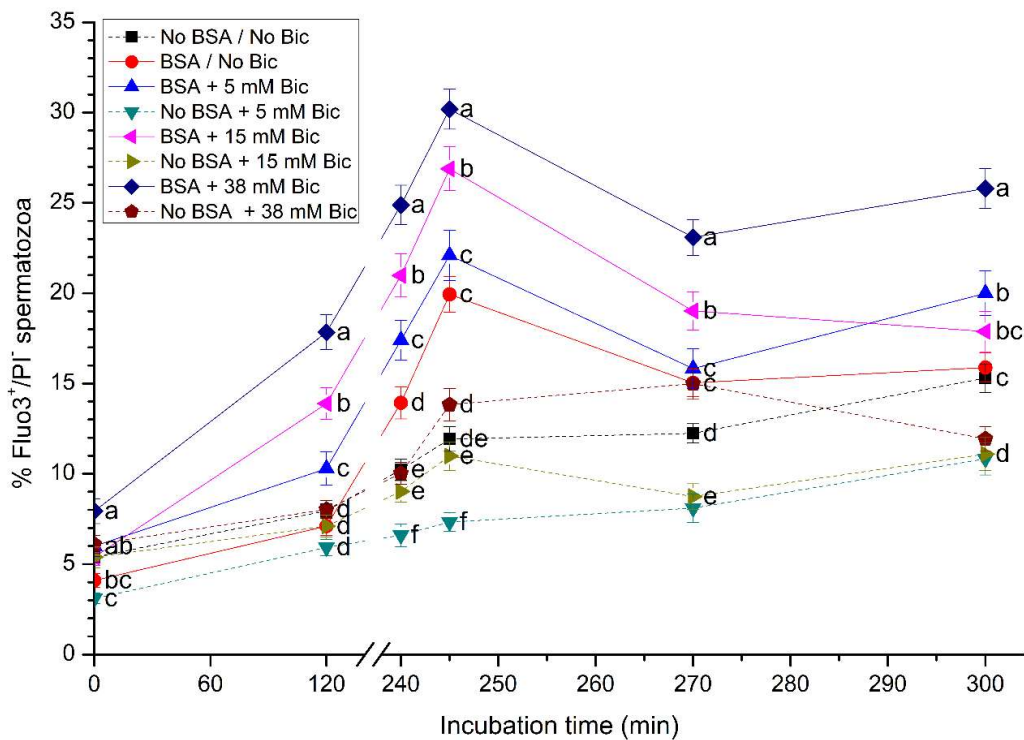


861

862 **Fig 4B.** Percentages of FL2:FL1 ratio in the sperm population with high mitochondrial
 863 membrane potential (JC-1_{agg}) of boar spermatozoa subjected to in vitro capacitation and
 864 subsequent in vitro acrosome exocytosis in different capacitation mediums. Different letters
 865 mean significant ($P < 0.05$) differences between treatments at a given time point.

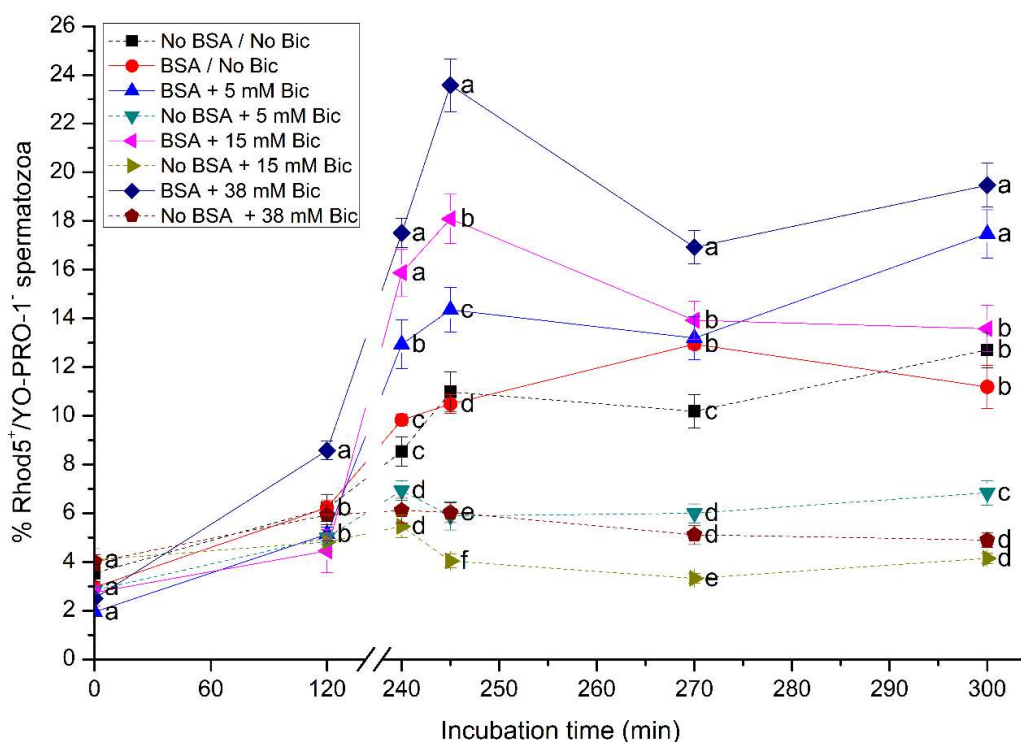
866

867



868

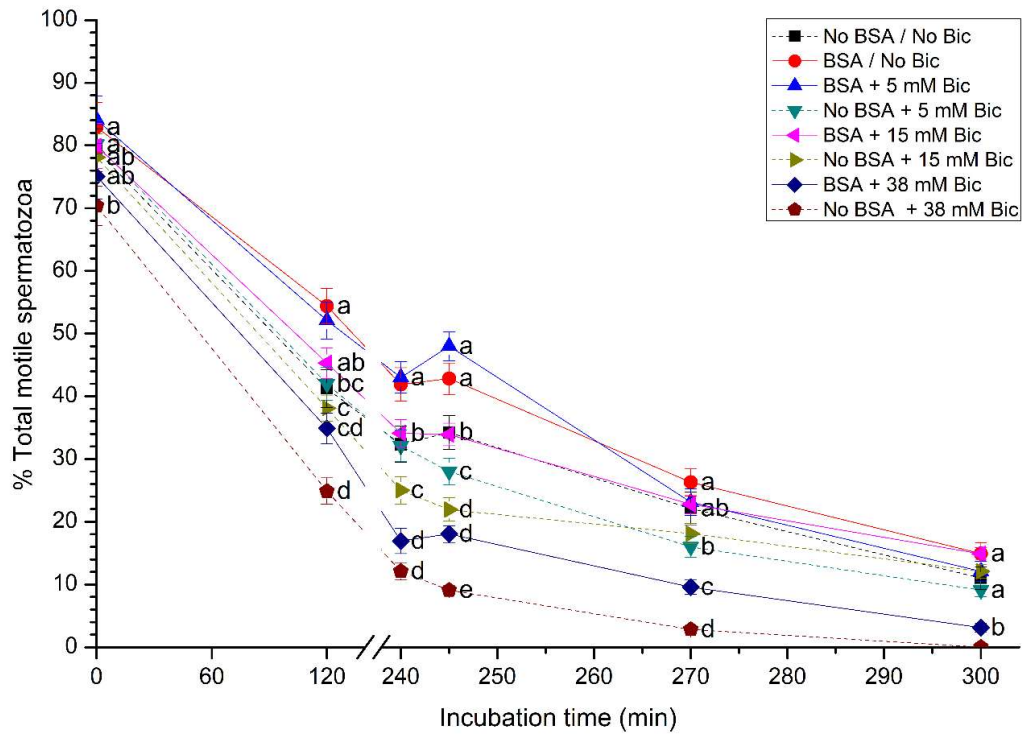
869 **Fig 5.** Percentages of intracellular calcium levels of boar spermatozoa subjected to in vitro
 870 capacitation and subsequent in vitro acrosome exocytosis in different capacitation mediums.
 871 Different letters mean significant ($P < 0.05$) differences between treatments at a given time point.



872

873 **Fig 6.** Percentages of intracellular calcium levels of boar spermatozoa subjected to in vitro
 874 capacitation and subsequent in vitro acrosome exocytosis in different capacitation mediums.
 875 Different letters mean significant ($P < 0.05$) differences between treatments at a given time point.

876



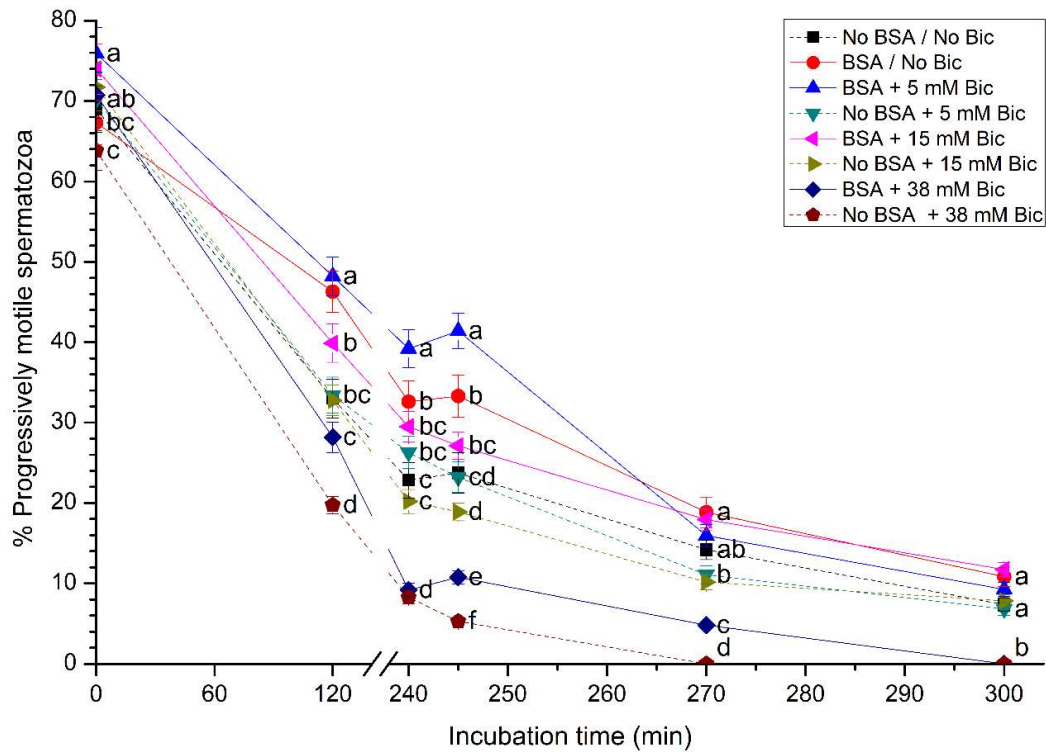
877

878 **Fig 7.** Percentages of total motility of boar spermatozoa subjected to in vitro capacitation and
 879 subsequent in vitro acrosome exocytosis in different capacitation mediums. Different letters
 880 mean significant ($P < 0.05$) differences between treatments at a given time point.

881

882

883



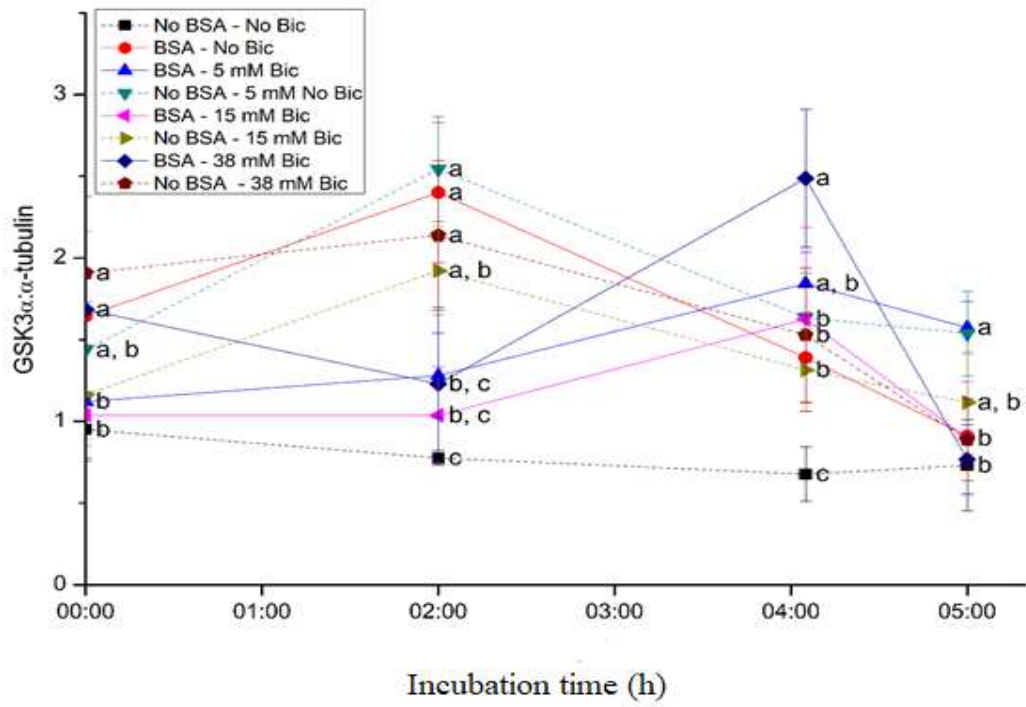
884

885 **Fig 8.** Percentages of total progressively of boar spermatozoa subjected to in vitro capacitation
 886 and subsequent in vitro acrosome exocytosis in different capacitation mediums. Different letters
 887 mean significant ($P < 0.05$) differences between treatments at a given time point.

888

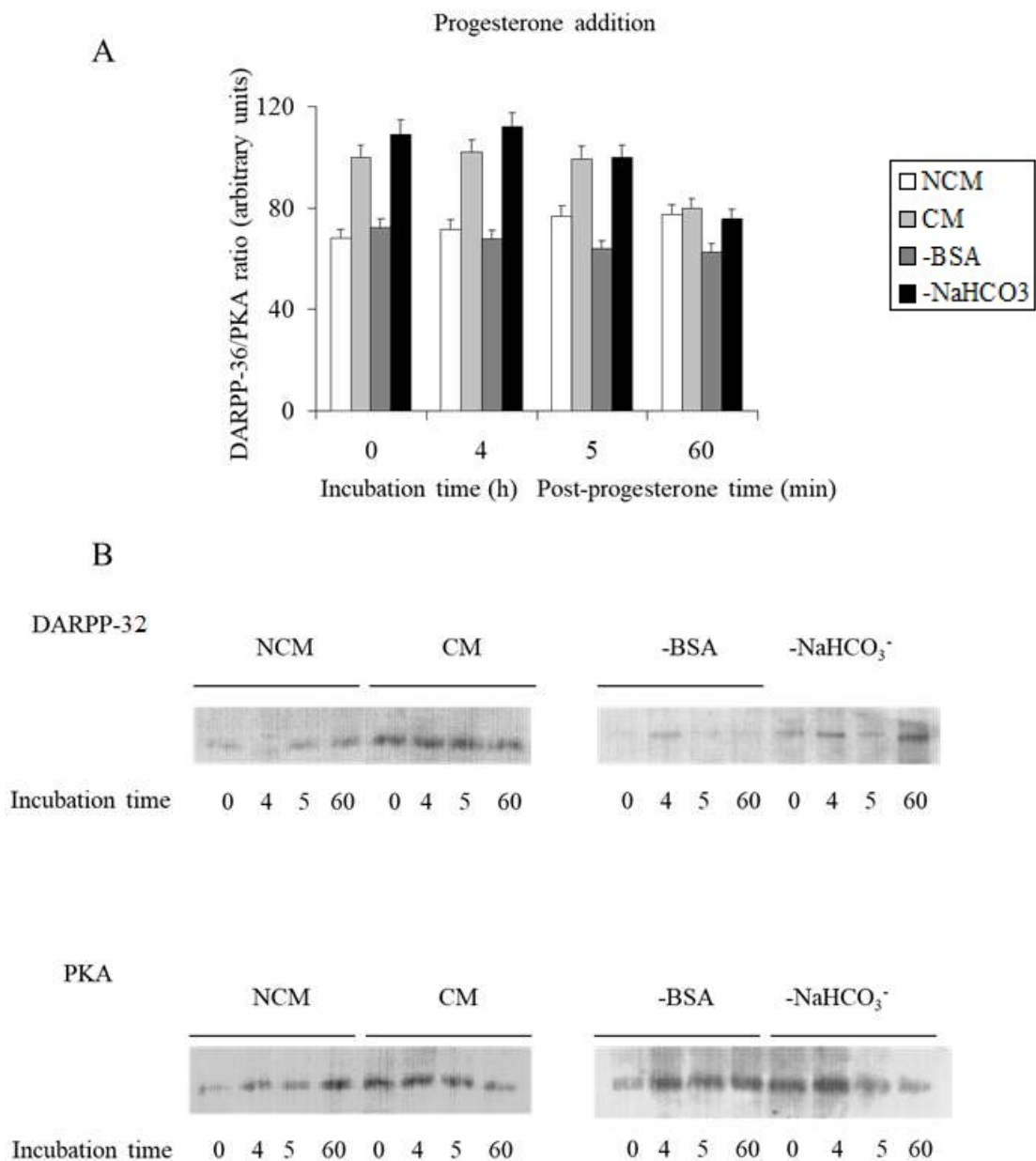
889

890



891

892 **Fig 9.** Percentages of GSK3 α tyrosine phosphorylation of boar spermatozoa subjected to in vitro
 893 capacitation and subsequent in vitro acrosome exocytosis in different capacitation mediums.
 894 Different letters mean significant (P<0.05) differences between treatments at a given time point.
 895



896

897

898 **Fig 10.** Percentages of DARPP-32/PKA phosphorylation of boar spermatozoa subjected to in
 899 vitro capacitation and subsequent in vitro acrosome exocytosis in different capacitation mediums.
 900 NCM= non-capacitating medium (without BSA and bicarbonate); CM= capacitating medium
 901 (with BSA and bicarbonate 38mM).

902