



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado

Efecto de progesterona y estradiol en los procesos de
capacitación y apoptosis del espermatozoide ovino

Autor/es

Neus Callizo Esteve

Director/es

Adriana Casao Gascón y M^a Teresa Muiño Blanco

Facultad de Veterinaria

2015

ÍNDICE

1. Resumen.....	2
2. Introducción.....	4
3. Justificación y objetivos.....	8
4. Material y métodos.....	9
4.1. Obtención de semen.....	9
4.2. Método de lavado y selección de espermatozoides: swim-up/dextrano.....	10
4.3. Incubación de las muestras con dosis fisiológicas de 17β -estradiol y progesterona....	12
4.4. Métodos de evaluación de las muestras seminales.....	13
4.4.1. Viabilidad celular o integridad de membrana.....	14
4.4.2. Capacitación espermática.....	15
4.4.2.1. Análisis de motilidad espermática.....	15
4.4.2.2. Estado de capacitación mediante la tinción con clorotetraciclina (CTC)....	16
4.4.3. Estado de apoptosis.....	18
4.4.4. Análisis estadístico.....	19
5. Resultados y discusión.....	20
5.1. Influencia de los tratamientos hormonales en viabilidad celular (integridad de membrana).....	20
5.2. Influencia de los tratamientos hormonales en la capacitación espermática.....	20
5.2.1. Análisis de motilidad espermática.....	20
5.2.2. Estado de capacitación mediante la tinción con clortetraciclina (CTC).....	22
5.3. Influencia de los tratamientos hormonales en el estado de apoptosis.....	23
6. Conclusiones.....	25
7. Valoración personal.....	26
8. Bibliografía.....	27
9. Anexos.....	34
9.1. Abreviaturas.....	34

1. RESUMEN

Tras la cópula, los espermatozoides pasan a un medio, primero al fluido uterino y posteriormente al fluido oviductal, donde entran en contacto con las hormonas predominantes en la hembra: los estrógenos y la progesterona, cuyos efectos sobre el espermatozoide ovino todavía no están muy estudiados.

En este trabajo se han evaluado el efecto *in vitro* de dos dosis (alta y baja) de progesterona (P_4 , 10 ng/mL y 100 pg/mL) y de 17β -estradiol (E_2 , 1 ng/mL y 10 pg/mL) sobre la calidad del espermatozoide ovino. Las técnicas laboratoriales utilizadas han sido el análisis de motilidad espermática mediante un sistema de análisis computerizado (CASA), viabilidad o integridad de membrana mediante la doble tinción de diacetato de carboxifluoresceína/ioduro de propidio, la capacitación espermática mediante la tinción con clorotetraciclina (CTC) y los procesos de apoptosis (inversión de fosfatidilserina) mediante la tinción con anexina V. No se observaron diferencias significativas en motilidad, viabilidad ni tinción con anexina V, aunque las muestras incubadas con concentraciones altas de E_2 presentaron peores valores que el resto de los grupos de estudio. Sin embargo, en las muestras incubadas con concentraciones altas de P_4 el porcentaje de espermatozoides capacitados aumentó significativamente ($P < 0,05$) con respecto a la muestra control. Estos resultados indican que la incubación con una concentración elevada de P_4 (10 ng/mL) estimula el proceso de capacitación de los espermatozoides, sin afectar al resto de parámetros de calidad seminal, mientras que la incubación con estrógenos a concentraciones elevadas (1 ng/mL) parece afectar negativamente a la calidad espermática.

Palabras clave: 17β -estradiol, Progesterona, Espermatozoides, Capacitación, Apoptosis.

ABSTRACT

After the coitus, the sperms enter into the uterine fluid and later into the oviduct, where they are in contact with the predominant hormones in the female reproductive tract: oestrogens and progesterone, whose effects on ovine spermatozoa are not still too much studied.

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* effect of two doses (high and low) of progesterone (P_4 , 10 ng/mL y 100 pg/mL) and 17β -oestradiol (E_2 , 1 ng/mL y 10 pg/mL) the quality of ovine sperm. The laboratorial techniques used were a motility analysis through a computer assisted sperm analysis (CASA), a viability or membrane integrity test through the double stain carboxifluorescein/propidium iodide, a sperm capacitation through the chlortetracycline stain (CTC) and the apoptotic process (phosphatidylserine inversion) through the annexin V stain. There

was no significant differences in motility, viability and annexin V staining, but after the addition of a higher dose of E₂ (1ng/mL), the number of viable, non-apoptotic and total motile spermatozoa was lower than in the rest of studied groups. Nevertheless, the percentage of capacitated spermatozoa increased significantly (P<0,05) in the samples incubated with a higher dose of P₄ in respect with the control sample. The results reveal that incubation with a higher dose of P₄ (10 ng/mL) promotes the capacitation process, without affecting the rest of the parameters of seminal quality, while the incubation with a higher dose of oestrogens (1ng/mL) seems to cause reduction of sperm quality.

Key words: 17β-oestradiol, Progesterone, Spermatozoa, Capacitation, Apoptosis.

2. INTRODUCCIÓN

Los machos suelen ser los grandes olvidados en las explotaciones ovinas, y sin embargo son uno de los factores responsables de la producción de corderos, pudiendo causar un alto porcentaje de fallos reproductivos si no se tratan como es merecido. Hacer un seguimiento de los resultados reproductivos en las explotaciones es importante para evitar la toma de decisiones basadas en teorías. El presente estudio pretende continuar ampliando los conocimientos en cuanto a la fisiología de la reproducción ovina, centrándose particularmente en los machos de la especie.

En el proceso reproductivo intervienen tres elementos básicos: hipotálamo, hipófisis y gónadas. Las neuronas del hipotálamo sensibles a los esteroides ováricos (estradiol y progesterona) registran variaciones dependiendo de la fase del ciclo sexual y también de la época del año. Así, las neuronas secretoras del hipotálamo secretan GnRH (o no), que se une a los receptores de las células gonadotropas en la hipófisis y secretan LH (en mayor parte) y FSH, siendo las gónadas su órgano diana. Entre los estrógenos, el estradiol, secretado por los folículos preovulatorios, es la hormona predominante durante el estro de la hembra. Tras la ovulación, sus niveles decaen, aumentando los de progesterona debido a la formación del cuerpo lúteo.

Por otro lado, para que un ovocito sea fecundado con éxito, los espermatozoides deben llevar a cabo diversos procesos tales como la capacitación, la adquisición de movimiento hiperactivado y la reacción acrosómica. La capacitación espermática (Figura 2.1) es un proceso imprescindible que conlleva cambios en la membrana plasmática (Gadella *et al.* 2008), movimientos en el calcio intracelular (Lishko *et al.* 2011) y una serie de cascadas de transducción de señales bioquímicas (Grasa *et al.* 2006; Tulsiani *et al.* 2007). Al final del proceso de capacitación el espermatozoide adquiere el movimiento de hiperactivación, motilidad progresiva caracterizada por movimientos desordenados de la cabeza y el flagelo para penetrar en el ovocito; y la reacción acrosómica, un proceso de exocitosis que permite que el espermatozoide penetre en la zona pelúcida del ovocito. Dado que estos procesos ocurren fisiológicamente en el tracto genital de la hembra, es probable que estén involucradas algunas hormonas esteroideas presentes en ese ambiente, principalmente los estrógenos, entre los que destaca el 17- β estradiol (E_2), y la progesterona (P_4). De hecho, estas acciones de los estrógenos y la progesterona se podrían producir mediante la unión de estas hormonas a receptores específicos situados en las membranas de los espermatozoides ovinos identificados recientemente (Casao *et al.* 2011).

Como se ha comentado anteriormente, en las hembras de los mamíferos domésticos la concentración de E_2 aumenta durante el estro y hasta el momento de la ruptura folicular. Durante

mucho tiempo, los estrógenos se han considerado hormonas femeninas, contribuyendo a la salud de la hembra y a su fertilidad. Sin embargo, en los últimos años se ha descubierto que juegan un papel muy importante tanto en los machos (Korach *et al.* 1996; Hess *et al.* 1997; Luconi *et al.* 2002) como en las células espermáticas.

Trabajos previos han demostrado que la presencia de estrógenos en el tracto reproductor femenino mantiene la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides (Hunter 1988). La motilidad espermática es uno de los mecanismos primarios que permiten a las células ser transportadas hasta el ovocito, por lo que está íntimamente relacionada con la fertilidad. De hecho, las células espermáticas sólo se transportan eficientemente durante el estro, o bien tras la administración de E₂ en hembras ovariectomizadas (Allison and Robinson 1972; Bedford 1972; Hunter 1988; Boquest and Summers 1999). De igual manera, otro estudio realizado en conejas demostró que la capacitación espermática se interrumpía en hembras ovariectomizadas, y se recuperaba en su totalidad tanto en útero como en oviducto tras ser estimuladas con estrógenos (Bedford 1970).

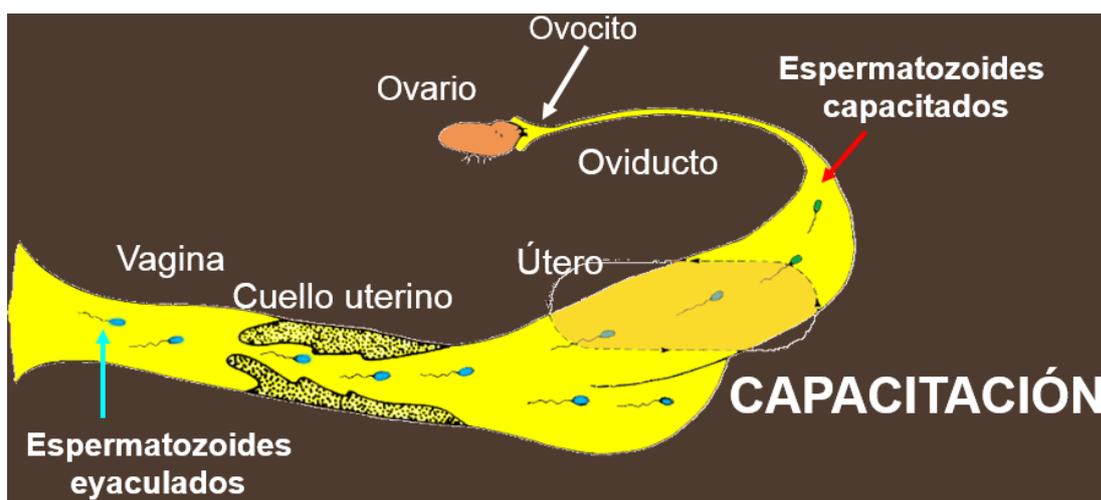


Figura 2.1 – Proceso de capacitación en el tracto genital de la hembra.

Otro estudio, realizado con semen de toro Holstein (Ciftci and Zulkadir 2010) incubado *in vitro* con estrógenos, demostró que la presencia de concentraciones bajas de esta hormona aumentaba la motilidad espermática total, al igual que la cantidad de espermatozoides móviles progresivos, a la vez que promovía el mantenimiento de los acrosomas intactos, lo cual es totalmente necesario para la unión del espermatozoide a la zona pelúcida. Sin embargo la viabilidad no mejoraba con la adición de bajas concentraciones de estrógenos, pero si se veía perjudicada con elevadas concentraciones de éstos.

Hay muy pocos estudios sobre el efecto del E₂ en el espermatozoide ovino ya que la mayoría de investigaciones con estrógenos se han focalizado en el efecto de la hormona en la

transferencia de espermatozoides en el tracto reproductivo de la hembra (Croker *et al.* 1975; Hawk and Cooper 1975; Hawk *et al.* 1978).

En el caso de la progesterona, estudios realizados a lo largo de las dos últimas décadas indican que la incubación con P4 *in vitro* estimula varias funciones como la hiperactivación, quimiotaxis, capacitación y reacción acrosómica (Muratori *et al.* 2009). En el caso del estradiol, su función parece más controvertida, y mientras que para algunos autores parece ser la de modular/inhibir los efectos de la P4 sobre la hiperactivación (Fujinoki 2010), la capacitación (Sebkova *et al.* 2012) o la reacción acrosómica (Vigil *et al.* 2008), otros sugieren un efecto estimulador sobre la capacitación, reacción acrosómica y capacidad fecundante (Mohamed *et al.* 2011). Otros estudios han investigado el efecto conjunto de la progesterona y el estradiol en la penetración espermática en un proceso de fertilización *in vitro* en la especie bovina. Los resultados indicaron que el tiempo de penetración de espermatozoides se veía reducido tras añadir progesterona y 17 β -estradiol al influir en el proceso de capacitación o bien en la reacción acrosómica (Chian *et al.* 1996).

Finalmente, algunos estudios bastante recientes sugieren que estas hormonas no solo influirían en la capacitación, sino que también podrían aumentar la supervivencia espermática y la protección frente a los procesos apoptóticos (Aquila *et al.* 2004; De Amicis *et al.* 2012).

La muerte celular puede ocurrir, en general, por dos diferentes vías, necrosis y apoptosis. La necrosis es un proceso pasivo resultado de un daño que causa la ruptura de la membrana. Durante la necrosis, los contenidos celulares se liberan de forma incontrolada al ambiente que rodea la célula, lo cual causa un daño en las de alrededor y una respuesta inflamatoria. En cambio, la apoptosis es un proceso activo que sigue a una secuencia de pasos controlados (Figura 2.2) es un proceso autodestructivo que no causa ningún tipo de reacción inflamatoria (Lockshin and Williams 1964; Kerr *et al.* 1972; Wyllie *et al.* 1980). Las células apoptóticas se caracterizan por algunos cambios morfológicos, especialmente en la superficie celular (translocación de fosfatidilserina, contracción celular etc.) y en el núcleo (fragmentación, hipercondensación de la cromatina y degradación del ADN). La apoptosis puede iniciarse por un estímulo externo (vías extrínsecas) o interno (vías intrínsecas). En la mayoría de casos, un componente central del mecanismo de apoptosis son unas proteasas denominadas caspasas (cysteinyll aspartate-specific proteases), aunque el proceso no es totalmente dependiente de ellas (Marti *et al.* 2008). En el caso de las células reproductoras, reducir el número de éstas mediante este mecanismo, hace que la población pueda ser mantenida por las células de Sertoli (Rodríguez *et al.* 1997; Blanco-Rodríguez 1998; Kierszenbaum 2001).

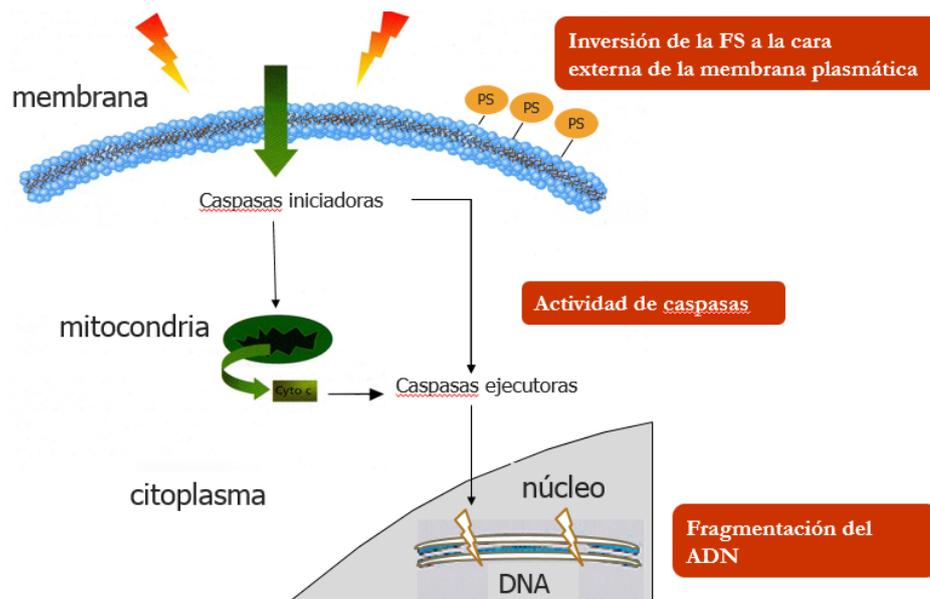


Figura 2.2 – Parámetros apoptóticos del espermatozoide.

Es posible que la presencia de espermatozoides apoptóticos en las dosis seminales sea una de las causas que disminuyan la fertilidad, tal como se demostró en humanos (Taylor *et al.* 2004; Said *et al.* 2006) y en bovinos (Anzar *et al.* 2002). A pesar de todo, algunos autores consideran que la translocación de fosfatidilserina es un proceso fisiológico que ocurre durante la capacitación espermática (Gadella and Harrison 2002) mientras que para otros es un signo de daño celular, una de las características del proceso apoptótico (Muratori *et al.* 2004; Kurz *et al.* 2005).

Estudios previos demostrado que en el espermatozoide ovino (Marti *et al.* 2008) al igual que en el de otras especies (Gadella and Harrison 2002; Kurz *et al.* 2005), se produce un aumento del porcentaje de espermatozoides que muestran inversión de fosfatidilserina, un marcador apoptótico, tras los procesos de capacitación y reacción acrosómica, por lo que, si tanto estradiol como progesterona son capaces de modular el proceso de capacitación, también es posible que tengan capacidad de modular algunos aspectos del proceso apoptótico.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las hormonas esteroideas, 17- β estradiol y progesterona, presentes en el tracto genital de la hembra durante el proceso de fecundación, se han postulado recientemente como compuestos reguladores no solo de los procesos de capacitación y reacción acrosómica, sino también en los procesos apoptóticos, tanto en la especie humana como en mamíferos domésticos (Baldi *et al.* 2009). Sin embargo, apenas hay estudios sobre el efecto de las hormonas esteroideas en el espermatozoide ovino.

Por tanto, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto de dosis fisiológicas de estas dos hormonas esteroideas sobre la calidad espermática en la especie ovina *in vitro*.

La calidad espermática se evaluará desde varias perspectivas:

1. Motilidad espermática.
2. Integridad de membrana.
3. Nivel de apoptosis.
4. Grado de capacitación espermática.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Obtención de semen

Las muestras seminales se obtuvieron a partir de 9 sementales (Figura 4.1) de raza Rasa Aragonesa, donados por ANGRA (Asociación Nacional de Ganaderos de Rasa Aragonesa) y estabulados en el Servicio de Apoyo a la Experimentación Animal (SAEA) de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza.



Figura 4.1 – Machos estabulados en el SAEA donados por ANGRA.

El semen se obtuvo siempre en días alternos (Ollero *et al.* 1994; Ollero *et al.* 1996; Ollero *et al.* 1996) mediante vagina artificial (Figura 4.2), método de elección en la especie ovina ya que el macho al eyacular desarrolla toda la cadena de reflejos y la mecánica de un coito fisiológico. Para la realización de este estudio han sido empleadas mezclas de segundos eyaculados de ovino en base a resultados previos obtenidos en el equipo de investigación, los cuales demostraban que éstos tienen una calidad mayor frente a los primeros eyaculados (Ollero *et al.* 1994). El soporte en esta especie es necesario que sea una hembra, sana y tranquila, si el macho está entrenado no es necesario que ésta se encuentre en celo natural ni hormonado.



Figura 4.2 – Obtención de semen de machos ovinos mediante el método de vagina artificial.

4.2. Método de lavado y selección de espermatozoides: Swim-Up/Dextrano

Todos los reactivos, excepto los que se especifica, se adquirieron en Sigma-Aldrich, San Luis, MO, Estados Unidos.

La selección y lavado espermático se realizó mediante el método de swim-up/dextrano (Alvarez *et al.* 1993). Este método se basa en la habilidad de los espermatozoides “nadar” desde el eyaculado hacia la superficie atravesando una capa intermedia (Figura 4.3). El swim-up estándar (Berger *et al.* 1985) incluye algunos procesos de centrifugación, lo cual perjudica la calidad de las células, por eso una técnica swim-up modificada (sin centrifugación) fue desarrollada por Alvarez *et al.* para la separación de espermatozoides humanos móviles usando mHTF (*modified human tubal fluid médium*) (Quinn *et al.* 1985).

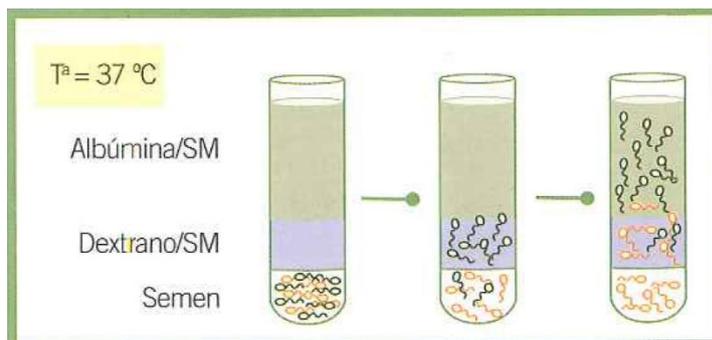


Figura 4.3 – Selección de espermatozoides mediante el método swim-up/dextrano (Alfonso Abecia Martínez 2010)

El procedimiento de swim-up/dextrano usado en este estudio fue desarrollado de acuerdo con el método de Alvarez et al. con algunas modificaciones, entre las que se incluyen la sustitución de gran parte del NaCl y del KCl del medio mHTF por sacarosa, y la eliminación del CaCl₂ y el NaHCO₃ para evitar la capacitación espermática durante este proceso de swim-up. Por lo tanto, el medio resultante presenta la siguiente composición final (Tabla 4.1):

Tabla 4.1 – Composición del medio mHTF.

Sales	
NaCl (0,05 M)	50 mM
KCl (0,01 M)	10 mM
MgSO ₄ (anhidro)	0.4 mM
K ₂ HPO ₄	0,3 mM
Azúcares	30 mL
Hepes	21 mM
Glucosa	2,8 mM
Piruvato	0,3 mM
Lactato	18,6 mM
Sacarosa	200 mM

El medio es reconstituido el mismo día en que se vaya a realizar el swim-up.

El procedimiento consta de 4 pasos. Se recogen alícuotas de 500 µl de semen y se depositan en el fondo de un tubo de base redondeada o tubo para swim-up de 15 mm de diámetro. Sobre éste, se depositan 500 µl de mHTF-Dextrano (30 mg Dx/ml mHTF) dejando que se deslicen por las paredes del tubo para que las fases no se mezclen. Para finalizar, se añaden 1,5 ml de mHTFA (5mg BSA/ml mHTF). Los tubos deben incubarse en posición vertical en una estufa a 37°C durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se recogen con una pipeta 750 µl de sobrenadante y se reemplazan

por el mismo volumen de mHTFA. Estos primeros 750 µl obtenidos deben ser desechados ya que todavía no poseen la calidad deseada además de una elevada contaminación de plasma seminal. La operación debe ser repetida 3 veces, obteniendo un volumen total de 2,25 ml de suspensión seminal (GarcíaLopez *et al.* 1996).

4.3. Incubación de las muestras con dosis fisiológicas de 17β-estradiol y progesterona

Los espermatozoides obtenidos mediante la técnica swim-up se diluyen en medio mHTFA hasta una concentración de 3×10^7 espermatozoides/ml y se incubarán durante 3 horas a 39 °C en una estufa con un 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa con dos dosis de progesterona y 17β-estradiol. Las concentraciones hormonales utilizadas se muestran en la Tabla 4.2., y se basan en las concentraciones fisiológicas en distintos fluidos de la oveja (Figura 4.4):

Tabla 4.2 – Concentraciones hormonales en la incubación de muestras.

17β-estradiol	Ealto	1 ng/ml E ₂	Es la concentración que se halla en fluido folicular (Carson <i>et al.</i> 1981). Lo cierto es que se desconoce si en el fluido oviductal la concentración es diferente, se cree que la hormona podría transportarse desde el fluido folicular al oviducto
	Ebajo	10 pg/ml E ₂	Concentración que se halla en sangre durante el pico pre-ovulatorio de LH
Progesterona	Palta	10 ng/ml P ₄	Dos veces la concentración que se halla en sangre en fase luteal. Aun así, se usa porque en otras especies se ha demostrado que los espermatozoides se capacitan <i>in vitro</i> con altos niveles de progesterona
	Pbaja	100 pg/ml P ₄	Concentración basal de progesterona en sangre



Figura 4.4 – Concentraciones de progesterona y estradiol en sangre a lo largo del ciclo reproductivo de la oveja (Alfonso Abecia Martínez 2010).

Junto con estas muestras se incubó una muestra control, en la que únicamente se añadió el diluyente utilizado en ambas hormonas (DMSO 1/10.000 (v/v))

Para obtener las concentraciones partimos de stocks de progesterona (10 mg/mL) y estrógenos (1 mg/mL) diluidas en DMSO, que se diluyeron en PBS hasta conseguir las concentraciones deseadas.

Por tanto, los grupos experimentales utilizados en este estudio fueron:

- Muestra inicial (0 h): Espermatozoides obtenidos tras el swim-up.
- Muestra control (C): DMSO 1/10.000 (v/v).
- Muestra con concentración alta de estrógenos (Ealto): 17 β -estradiol (1 ng/mL).
- Muestra con concentración baja de estrógenos (Ebajo): 17 β -estradiol (10 pg/mL).
- Muestra con concentración alta de progesterona (Palta): progesterona (10 ng/mL).
- Muestra con concentración baja de progesterona (Pbaja): progesterona (100 pg/mL).

4.4. Métodos de evaluación de las muestras seminales

La evaluación de la calidad espermática se realizó tanto tras el swim-up como al final de la incubación con hormonas.

Para determinadas tinciones, las muestras se diluyeron en medio bifase (Tabla 4.3).

Tabla 4.3 – Composición del medio bifase.

Sacarosa	0,25 M
EGTA	100 mM
Tampón fosfato sódico (pH7,5)	0,5 M
Tampón HEPES	10 X
Agua miliQ	Hasta enrasar

Los análisis que se realizaron fueron los siguientes:

4.4.1. Viabilidad celular o integridad de membrana

La viabilidad o integridad de membrana se evaluó mediante una doble tinción con yoduro de propidio y diacetato de carboxifluoresceína (Harrison and Vickers 1990). Esta técnica se basa en la distinta coloración que presentan los espermatozoides viables y no viables, en función de la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática. Los espermatozoides de los distintos grupos se resuspendieron hasta una concentración de 6×10^6 espermatozoides/mL a los que se añadió 3 μ L de diacetato de carboxifluoresceína (0,46 mg/mL en DMSO), 3 μ L de yoduro de propidio (0,5 mg/mL en agua miliQ) y 3 μ L de formaldehído (al 0,5 % (v/v) en agua miliQ). Las muestras teñidas se dejan incubar a 37°C durante 10 minutos y se evalúan mediante citometría de flujo.

En el citómetro se diferencian 4 subpoblaciones celulares (Figura 4.5 y Figura 4.6):

- Células no teñidas: cuadrante inferior izquierdo.
- Células viables: cuadrante inferior derecho. Son células que poseen capacidad de hidrolizar, mediante esterasas, el diacetato de carboxifluoresceína (incoloreo y permeable a la membrana celular) a carboxifluoresceína (color verde e impermeable a la membrana celular) y que además presentan impermeabilidad al yoduro de propidio al tener la membrana plasmática intacta.
- Células no viables: cuadrante superior izquierdo. Células con la membrana dañada que adquieren una tinción roja al ser su membrana permeable al yoduro de propidio.
- Células no viables con acrosoma intacto: cuadrante superior derecho. Células teñidas con ambos colorantes, ya que tienen la membrana plasmática dañada (penetra el yoduro de

propidio) pero la membrana acrosomal intacta (permite la retención de carboxifluoresceína en el acrosoma). Estos espermatozoides se incluyen también en el grupo de no viables.

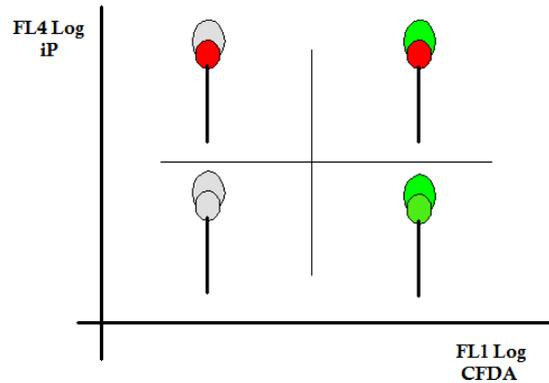


Figura 4.5 – Representación gráfica de las distintas poblaciones espermáticas que se obtienen tras la doble tinción de CFDA/IP y su posición en el diagrama obtenido en el citómetro de flujo.

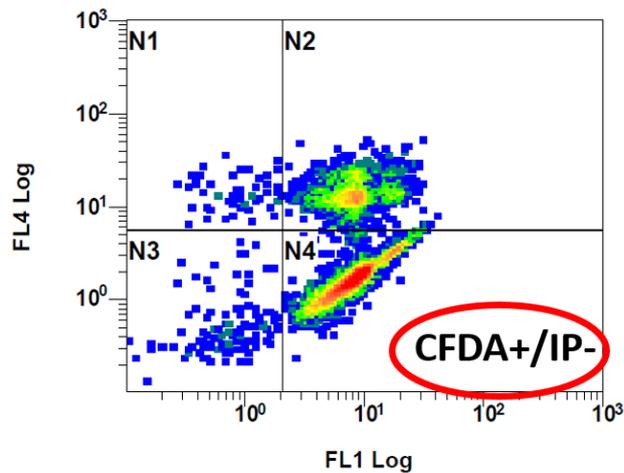


Figura 4.6 – Imagen representativa de las distintas poblaciones espermáticas obtenidas en citometría de flujo con la doble tinción de viabilidad CFDA/IP.

4.4.2. Capacitación espermática

4.4.2.1. Análisis de motilidad espermática

Para el análisis de la motilidad espermática se utilizó un sistema de análisis computerizado (CASA). Una gota de 6 μ L de cada muestra, a una concentración de 3×10^7 espermatozoides/mL, se

coloca entre un porta y un cubreobjetos atemperados. Se utilizó un microscopio de contraste de fases con un objetivo x10 y la motilidad se analizó con el programa ISAS (Proiser, España) (Figura 4.7). Se analizaron 5 campos por gota. Los parámetros analizados fueron motilidad espermática total y motilidad espermática progresiva.

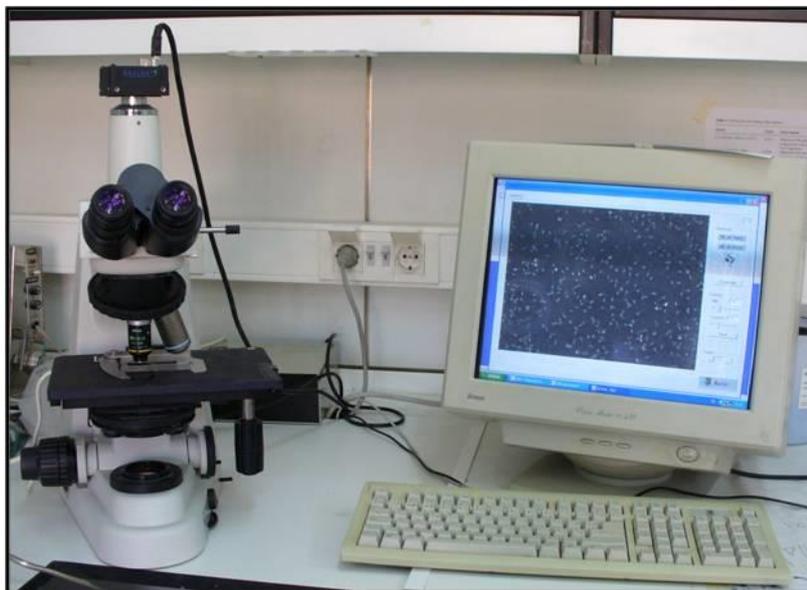


Figura 4.7 – Análisis de motilidad a través de un monitor de ordenador con el programa ISAS.

4.4.2.2. Estado de capacitación mediante la tinción con clorotetraciclina (CTC)

La clorotetraciclina (CTC) es un antibiótico que se une al calcio intracelular dando una tinción amarillo fluorescente, lo que nos permite determinar el estado de capacitación de los espermatozoides.

El proceso de tinción fue el siguiente: se mezclaron 2 mg de CTC (se pesan el mismo día en que vaya a realizarse la tinción) con 5 mL de Buffer CTC (Tabla 4.4). Se agitó en balancín y se conservó en refrigeración y oscuridad hasta su uso.

Tabla 4.4 – Composición de la solución BUFFER para CTC

TRIS	20 mM
NaCl	130 mM
DL- Cisteína	5 μ M
Agua miliQ	Enrasar hasta el volumen deseado

Posteriormente se ajustó el pH de la solución a 7,8 y se filtró con un poro de 0,2 μ M. Conservar en frigorífico.

Se mezclaron 18 μL de muestra (concentración 3×10^7) con 2 μL de EthD preparado y se incubaron a 37°C durante 10 minutos en oscuridad. Tras la incubación se añadieron 20 μL de la solución con CTC y 5 μL de FADO y se conservó en nevera durante 30 minutos (máximo 24 horas).

Para preparar las muestras se necesitan porta y cubreobjetos alargados. Se recomienda realizar el proceso con la luz apagada ya que el antibiótico es sensible a ésta. Se depositó una gota de 2-3 μL de *antifading* (DABCO) sobre el portaobjetos, 4 μL de muestra teñida, y se mezcló con la punta de la pipeta. Seguidamente se colocó el cubreobjetos y se presionó suavemente con papel absorbente. Finalmente, se selló la muestra con esmalte de uñas. Se puede observar directamente la muestra o conservarla en congelador.

Las muestras se evaluaron con un microscopio de fluoresceína (Nikon, Tokio, Japón) con objetivo de inmersión 100x aumentos y filtro morado (V-2A): 380-420 nm de excitación.

La tinción permite diferenciar 3 poblaciones espermáticas: capacitados, no capacitados y reaccionados (Figura 4.8):

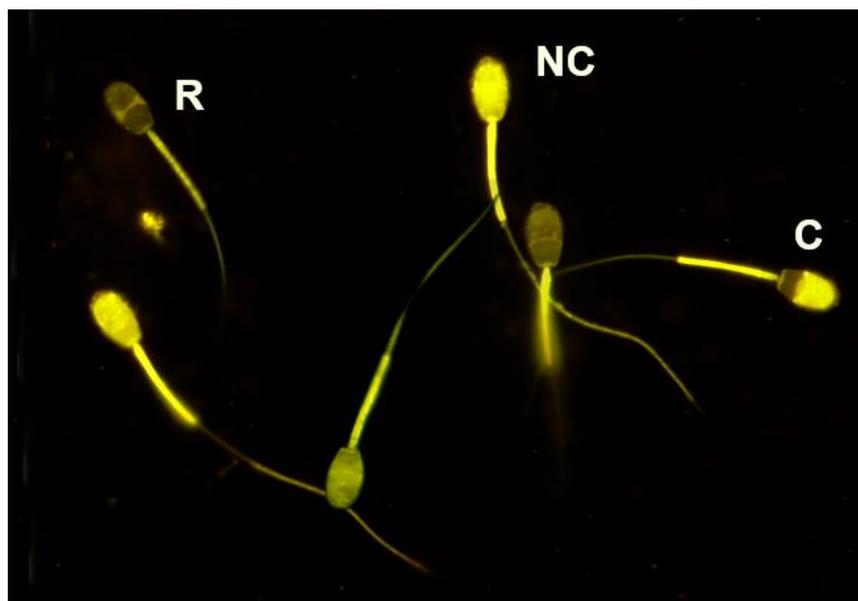


Figura 4.8 – Imagen de las poblaciones espermáticas obtenidas tras la tinción con clorotetraciclina. NC: espermatozoides no capacitados, C: espermatozoides capacitados, R: espermatozoides reaccionados.

4.4.3. Estado de apoptosis

Hay varios métodos para evaluar los cambios morfológicos y bioquímicos que sufren las células apoptóticas. En este estudio se evalúa la inversión de fosfatidilserina, fosfolípido que normalmente se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática, que se trasloca a la cara externa como consecuencia de procesos apoptóticos. El método utilizado se basa en la diferenciación de espermatozoides apoptóticos y no apoptóticos gracias al uso de anexina, una proteína que se une específicamente a la fosfatidilserina y que se comercializa ya unida a colorantes fluorescentes, combinada con la tinción de yoduro de propidio que permite diferenciar espermatozoides viables y no viables.

El tipo de anexina que se usa en este estudio se denomina Annexin V, fluorescein conjugate (FITC annexin V de Life Technologies, Carlsbad, California, Estados Unidos). El protocolo de tinción fue el siguiente: 20 μL de cada muestra (a una concentración de 3×10^7 espermatozoides/ml) se pipetearon en un tubo eppendorf opaco que contenía 250 μL del Buffer anexina (10x Binding Buffer, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, Estados Unidos), diluido 1:10 en agua miliQ. En oscuridad se añadió 1 μL de anexina FITC (es importante proteger la anexina de la luz en todo momento) y 3 μL de iP. Las muestras se dejaron incubar durante 10 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$ y posteriormente se añadieron 4 μL de FADO para fijar las células. Finalmente se añadieron otros 100 μL de Buffer anexina. Una vez preparadas las muestras se analizaron mediante citometría de flujo. En el diagrama que proporciona el citómetro se diferencian 4 subpoblaciones espermáticas diferentes (Figura 4.9):

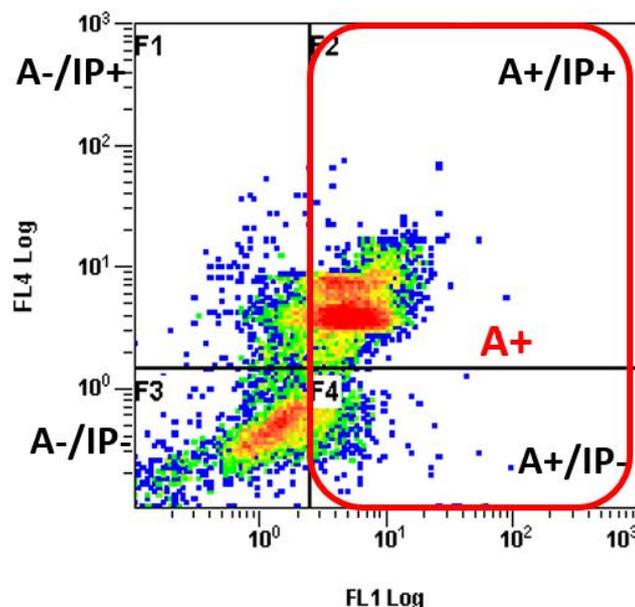


Figura 4.9 – Imagen representativa de las subpoblaciones espermáticas observadas mediante citometría de flujo tras la tinción con Anexina-V/iP.

- Espermatozoides viables no apoptóticos: cuadrante inferior izquierdo. Se trata de espermatozoides no teñidos ni con anexina ni con IP.
- Espermatozoides viables apoptóticos: cuadrante inferior derecho. Se trata de espermatozoides únicamente teñidos con anexina.
- Espermatozoides muertos por necrosis: cuadrante superior izquierdo. Se trata de espermatozoides teñidos únicamente con IP.
- Espermatozoides muertos por apoptosis: cuadrante superior derecho. Se trata de espermatozoides teñidos con IP y anexina.

Las células de interés se encuentran en el cuadrante inferior izquierdo (A-/IP-) ya que se consideran no apoptóticas y además, viables. También se evaluó el porcentaje de espermatozoides con inversión de fosfatidilserina (A+, figura 4.9).

4.4.4. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa *GraphPad Prism 5*. Se llevó a cabo un análisis de distribución de datos mediante el test de normalidad *Kolmogórov-Smirnov*. Dado que todos los resultados obtenidos siguen una distribución normal, se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Previamente a éste, se deben convertir los porcentajes obtenidos a su forma logarítmica.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Influencia de los tratamientos hormonales en viabilidad celular (integridad de membrana)

Como se puede apreciar en la tabla 5.1., no se encontraron diferencias estadísticas en viabilidad espermática entre los distintos tratamientos hormonales y el control. Estos resultados son consistentes con los de un estudio previo realizado con semen de toro Holstein en el que se demostró que la viabilidad no se modificaba con la adición de bajas concentraciones de estrógenos, pero sí se veía perjudicada con elevadas concentraciones de éstos (Ciftci and Zulkadir 2010). De igual manera, estos resultados también coinciden con los obtenidos tras la congelación de semen bovino con progesterona, en el que tampoco se observó mejoría ni empeoramiento de la viabilidad (Lukoseviciute *et al.* 2004).

Tabla 5.1 – Porcentaje de espermatozoides viables en muestras iniciales (0 h) y tras 3 h de incubación con distintas dosis de estrógenos y progesterona. Los resultados se muestran como media \pm EEM.

	0h	C	E alto	E bajo	P alta	P baja
Promedio (%)	78,33 \pm 2,93	72,47 \pm 3,67	70,38 \pm 4,64	71,15 \pm 5,50	73,77 \pm 4,47	73,61 \pm 4,49

5.2. Influencia de los tratamientos hormonales en la capacitación espermática

5.2.1. Análisis de motilidad espermática

No se obtuvieron diferencias significativas entre las muestras incubadas con las diferentes dosis hormonales, ni en motilidad total (Figura 5.1) ni en motilidad progresiva (Figura 5.2), aunque se observó una ligera disminución de estos parámetros en las muestras tratadas con dosis altas de estradiol.

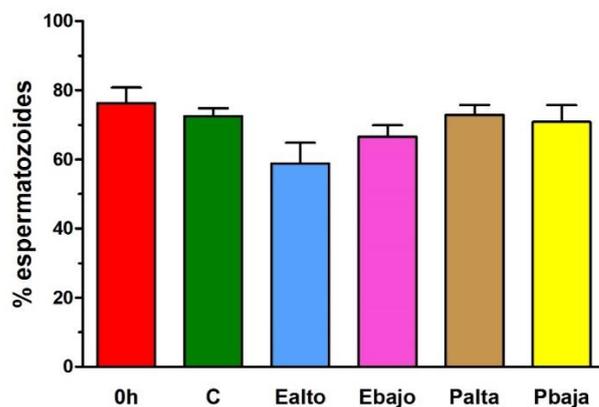


Figura 5.1 – Porcentaje de espermatozoides móviles en muestras iniciales (0 h) y tras 3 h de incubación con distintas dosis de estrógenos y progesterona. Los resultados se muestran como media \pm EEM.

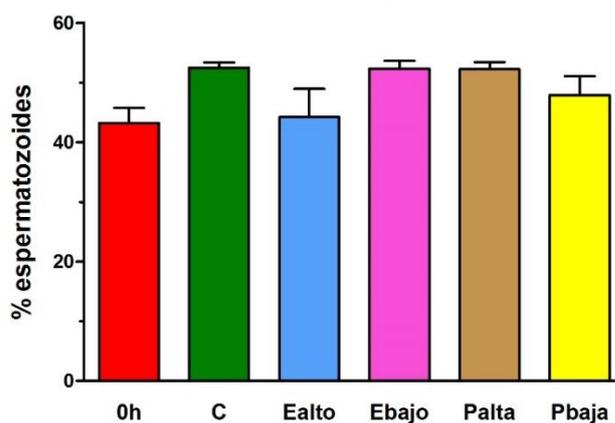


Figura 5.2 – Porcentaje de espermatozoides móviles progresivos en muestras iniciales (0 h) y tras 3 h de incubación con distintas dosis de estrógenos y progesterona. Los resultados se muestran como media \pm EEM.

Estos resultados difieren de estudios realizados en otras especies. En espermatozoides humanos la adición de progesterona aumentó la motilidad espermática (Uhler *et al.* 1992; Andersen and Jorgensen 1995), mientras que en el mono *Macaca fascicularis* la adición de progesterona en muestras de semen ya activados con cafeína y dbcAMP, se apreciaba una motilidad hiperactivada y un rápido aumento de la concentración de calcio intracelular. Como ya se ha comentado, la adición *in vitro* de bajas concentraciones de estrógenos a muestras seminales de toros Holstein aumentaba la motilidad de los espermatozoides (Ciftci and Zulkadir 2010). En el caso del ovino, como hemos demostrado en este estudio, ninguna de estas dos hormonas parece

que mejore la motilidad respecto a la muestra control, aunque sí parece mantenerla con la adición de progesterona a altas y estrógenos a bajas concentraciones.

5.2.2. Estado de capacitación mediante la tinción con clorotetraciclina (CTC)

El análisis del estado de capacitación de las distintos grupos experimentales mostró un porcentaje significativamente menor ($P < 0,05$) de espermatozoides no capacitados entre la muestra incubada con una dosis alta de progesterona y la muestra inicial (0 h) y la incubada con dosis baja de progesterona (Figura 5.3), y por tanto un porcentaje de células capacitadas significativamente mayor.

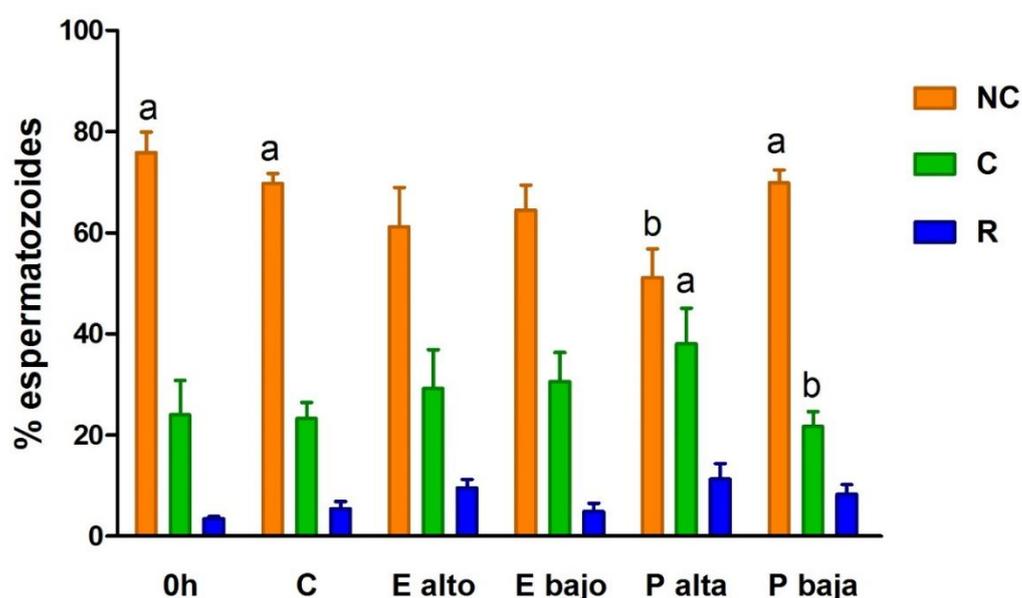


Figura 5.3 – Porcentaje de espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (C) y reaccionados (R), obtenidos mediante la tinción con clorotetraciclina (CTC), en muestras iniciales (0 h) y tras tres horas de incubación con distintas dosis de estrógenos y progesterona. Los resultados se muestran como media \pm EEM. Letras distintas indican diferencias significativas ($P > 0,05$).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos con espermatozoides de gato (Villaverde *et al.* 2009) que mostraron que el tratamiento con una concentración de progesterona alta (10 $\mu\text{g/ml}$) aumentaba la motilidad y el porcentaje de células reaccionadas. Igualmente, en otro experimento realizado con espermatozoides humanos se demostró que la progesterona aumentaba la motilidad espermática y estimulaba la reacción acrosómica (Osman *et al.* 1989; Uhler *et al.* 1992; Oehninger *et al.* 1994). Sin embargo, en semen de mono la progesterona

produce un rápido aumento de la concentración de calcio intracelular, paso previo a la capacitación (Gwathmey *et al.* 2000).

Así mismo, la adición de progesterona aumentó la capacitación espermática tras la descongelación de semen bovino, obteniendo un efecto máximo con 10 µg de P₄/ml tras 3 horas de incubación (Lukoseviciute *et al.* 2004), resultado comparable con el obtenido en la especie ovina.

Por otra parte, en el presente estudio, aunque la incubación con estradiol parece disminuir el porcentaje de espermatozoides no capacitados y aumentar el de capacitados, los resultados no llegan a ser significativos. Esto contrasta con un estudio realizado con espermatozoides de ratón capacitados y no capacitados, en el que se evaluó los posibles efectos de los estrógenos en cuanto a capacitación y fertilidad. En células no capacitadas incubadas con E₂ (10 y 100 µmol/L) se estimuló la capacitación y la reacción acrosómica, mientras que en las células ya capacitadas no se observó ningún efecto. Según este estudio, los estrógenos también tendrían un efecto positivo en la motilidad espermática (Adeoya-Osiguwa *et al.* 2003). Sin embargo, otros autores (Luconi *et al.* 1999) observaron que los estrógenos inhiben la reacción acrosómica promovida por la progesterona en el esperma humano.

5.3. Influencia de los tratamientos hormonales en el estado de apoptosis

El análisis de inversión de fosfatidilserina no mostró diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides viable sin inversión (Anexina - / IP -) ni en el de positivos a anexina (tabla 5.2). El porcentaje de espermatozoides que muestra inversión de fosfatidilserina en el grupo tratado con dosis altas de estrógenos aumentó ligeramente, aunque este aumento no fue significativo.

Tabla 5.2 – Resultados obtenidos con la tinción de Anexina valorada mediante citometría de flujo

	0h	C	E alto	E bajo	P alta	P baja
Promedio Anexina - / IP -	69,15 ± 2,71	65,95 ± 3,08	65,05 ± 3,20	68,03 ± 4,08	68,75 ± 4,79	66,68 ± 3,96
Promedio Anexina +	23,55 ± 2,55	20,92 ± 4,44	26,77 ± 3,60	23,37 ± 4,82	23,35 ± 4,92	24,33 ± 4,30

Esto contrasta con algunos estudios previos, que mostraron un aumento en la translocación de fosfatidilserina tras la capacitación y la reacción acrosómica (Marti *et al.* 2008), lo que no se observa en todos los grupos en este caso.

Del análisis global de los resultados obtenidos en este estudio se puede concluir que tanto el 17- β estradiol como la progesterona ejercen un cierto efecto sobre los espermatozoides ovinos *in vitro*. En las muestras incubadas con concentraciones altas de E₂ se puede observar cierto efecto negativo sobre la calidad espermática, ya que disminuye tanto la motilidad total como la progresiva, y aumenta la inversión de fosfatidiserina, aunque no de forma no significativa. Estos datos coinciden con algunos estudios realizados con semen de la especie bovina (Ciftci and Zulkadir 2010).

En el caso de la progesterona, se observó un aumento significativo del porcentaje de espermatozoides capacitados tras la incubación a concentraciones altas. A pesar de que los estrógenos son la hormona predominante en el tracto genital de la hembra durante el estro o celo, el análisis de los resultados de este trabajo permite concluir que es la progesterona a dosis altas, la hormona que induce mayor porcentaje de capacitación *in vitro*, como se ha demostrado en otras especies (Osman *et al.* 1989; Uhler *et al.* 1992; Oehninger *et al.* 1994; Gwathmey *et al.* 2000; Lukoseviciute *et al.* 2004; Villaverde *et al.* 2009). Aunque la dosis de progesterona más efectiva corresponde a la concentración de esta hormona en fase luteal, se debe considerar el hecho de que las concentraciones utilizadas se basan en niveles de progesterona en sangre, no en el útero ni en el oviducto, que son las que realmente podrían afectar al espermatozoide en el momento de la capacitación.

6. CONCLUSIONES

- La incubación de espermatozoides ovinos con dosis altas de progesterona (10 ng/mL) aumenta el porcentaje de espermatozoides capacitados *in vitro*.
- La incubación de espermatozoides ovinos con dosis altas de 17-β estradiol (1 ng/mL) parece disminuir la calidad espermática, aumentando el porcentaje de espermatozoides apoptóticos, y disminuyendo la motilidad total y la motilidad progresiva *in vitro*.
- La incubación de espermatozoides ovinos con dosis bajas de ambas hormonas (10 pg E₂/mL y 100 pg P₄/mL) no parece ejercer ningún efecto en los procesos de capacitación y apoptosis *in vitro*.

CONCLUSIONS

- A higher dose of P₄ (10 ng/mL) increases the percentage of capacitated ovine spermatozoa *in vitro*.
- A higher dose of 17-β oestradiol (1 ng/mL) seems to make a detrimental effect on sperm quality, increasing apoptotic spermatozoa and decreasing the motile number *in vitro*.
- A lower dose of E₂ (10 pg/mL) or P₄ (100 pg/mL) has no visible effect on the capacitation or apoptotic processes of ovine spermatozoa *in vitro*.

7. VALORACIÓN PERSONAL

En mi caso, la realización de este trabajo ha supuesto un aprendizaje desde cero. Mis conocimientos en el mundo de la investigación en general eran muy limitados, al igual que en el uso de técnicas laboratoriales en reproducción ovina. Aun así, emprendí el trabajo con bastantes ganas, aprendí todas las técnicas con la ayuda de algunos estudiantes del departamento, a manejar los programas de búsqueda bibliográfica gracias a mis tutoras, y poco a poco fui descubriendo cómo es el trabajo en el laboratorio. Tras varias semanas de experimentos conseguí los datos suficientes para redactar este estudio, que espero pueda ser útil en un futuro ampliando los conocimientos en fisiología ovina.

Una vez terminado el trabajo, puedo asegurar haber adquirido competencias en el análisis de calidad espermática ovina y el manejo de fuentes bibliográficas como *EndNote*. Me siento muy satisfecha por haber conseguido realizar un estudio de este tipo, haber aprendido tanto en tan poco tiempo, aunque evidentemente no lo habría conseguido sin la paciencia y tiempo dedicado de mis tutoras Adriana y M^a Teresa, como del resto del personal del laboratorio de la facultad.

8. BIBLIOGRAFÍA

Adeoya-Osiguwa, S. A., Markoulaki, S., Pocock, V., Milligan, S. R. and Fraser, L. R. (2003). "17 beta-estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function." Human Reproduction **18**(1): 100-107.

Alfonso Abecia Martínez, F. F. M. (2010). Manejo reproductivo en ganado ovino. Zaragoza, Servet.

Alvarez, J. G., Lasso, J. L., Blasco, L., Nunez, R. C., Heyner, S., Caballero, P. P. and Storey, B. T. (1993). "Centrifugation of Human Spermatozoa Induces Sublethal Damage - Separation of Human Spermatozoa from Seminal Plasma by a Dextran Swim-up Procedure without Centrifugation Extends Their Motile Lifetime." Human Reproduction **8**(7): 1087-1092.

Allison, A. J. and Robinson, T. J. (1972). "Recovery O Spermatozoa from Reproductive Tract of Spayed Ewe Treated with Progesterone and Estrogen." Journal of Reproduction and Fertility **31**(2): 215-&.

Andersen, C. Y. and Jorgensen, N. (1995). "Improvement of sperm motility by the addition of progesterone to the Percoll medium during sperm purification." Human Reproduction **10**(12): 3183-3185.

Anzar, M., He, L. W., Buhr, M. M., Kroetsch, T. G. and Pauls, K. P. (2002). "Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility." Biology of Reproduction **66**(2): 354-360.

Aquila, S., Sisci, D., Gentile, M., Middea, E., Catalano, S., Carpino, A., Rago, V. and Ando, S. (2004). "Estrogen receptor (ER)alpha and ER beta are both expressed in human ejaculated spermatozoa: Evidence of their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt pathway." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **89**(3): 1443-1451.

Baldi, E., Luconi, M., Muratori, M., Marchiani, S., Tamburrino, L. and Forti, G. (2009). "Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: Facts and fictions." Molecular and Cellular Endocrinology **308**(1-2): 39-46.

Bedford, J. M. (1970). "Influence of Oestrogen and Progesterone on Sperm Capacitation in Reproductive Tract of Female Rabbit." Journal of Endocrinology **46**(2): 191-&.

Bedford, J. M. (1972). Sperm transport, capacitation and fertilization. Reproductive Biology. Amsterdam, Eds Balin, H. & Glasser, S.: 338-392.

Berger, T., Marrs, R. P. and Moyer, D. L. (1985). "Comparison of Techniques for Selection of Motile Spermatozoa." Fertility and Sterility **43**(2): 268-273.

Blanco-Rodriguez, J. (1998). "A matter of death and life: the significance of germ cell death during spermatogenesis." International Journal of Andrology **21**(5): 236-248.

Boquest, A. C. and Summers, P. M. (1999). "Effects of 17 beta-oestradiol or oestrous stage-specific cow serum on the ability of bovine oviductal epithelial cell monolayers to prolong the viability of bull spermatozoa." Animal Reproduction Science **57**(1-2): 1-14.

Carson, R. S., Findlay, J. K., Clarke, I. J. and Burger, H. G. (1981). "Estradiol, Testosterone, and Androstenedione in Ovine Follicular-Fluid during Growth and Atresia of Ovarian Follicles." Biology of Reproduction **24**(1): 105-113.

Casao, A., Gallego, M., Perez-Pe, R., Muino-Blanco, T. and Cebrian-Perez, J. (2011). "Immunolocalization of estrogen receptor beta in ejaculated ram spermatozoa." Reproduction in Domestic Animals **46**: 93-93.

Ciftci, H. B. and Zulkadir, U. (2010). "The effect of oestradiol-17 beta on the motility, viability and the acrosomal status of bull sperm." South African Journal of Animal Science **40**(1): 6-13.

Crocker, K. P., Robinson, T. J. and Shelton, J. N. (1975). "Passage of Spermatozoa through Cervix of Ovariectomized Ewes Treated with Progesterone and Estrogen." Journal of Reproduction and Fertility **43**(3): 405-410.

Chian, R. C., Blondin, P. and Sirard, M. A. (1996). "Effect of progesterone and/or estradiol-17 beta on sperm penetration in vitro of bovine oocytes." Theriogenology **46**(3): 459-469.

De Amicis, F., Santoro, M., Guido, C., Sisci, D., Bruno, R., Carpino, A. and Aquila, S. (2012). "Progesterone through progesterone receptors affects survival and metabolism of pig sperm." Anim Reprod Sci **135**(1-4): 75-84.

Fujinoki, M. (2010). "Suppression of progesterone-enhanced hyperactivation in hamster spermatozoa by estrogen." Reproduction **140**(3): 453-464.

Gadella, B. M. and Harrison, R. A. P. (2002). "Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells." Biology of Reproduction **67**(1): 340-350.

Gadella, B. M., Tsai, P. S., Boerke, A. and Brewis, I. A. (2008). "Sperm head membrane reorganisation during capacitation." Int J Dev Biol **52**(5-6): 473-480.

GarciaLopez, N., Ollero, M., MuinoBlanco, T. and CebrianPerez, J. A. (1996). "A dextran swim-up procedure for separation of highly motile and viable ram spermatozoa from seminal plasma." Theriogenology **46**(1): 141-151.

Grasa, P., Cebrian-Perez, J. A. and Muino-Blanco, T. (2006). "Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation." Reproduction **132**(5): 721-732.

Gwathmey, T., Blackmore, P. F. and Mahony, M. C. (2000). "Progesterone-induced calcium influx in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa." Journal of Andrology **21**(4): 534-540.

Harrison, R. A. and Vickers, S. E. (1990). "Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa." J Reprod Fertil **88**(1): 343-352.

Hawk, H. W., Conley, H. H. and Cooper, B. S. (1978). "Number of Sperm in Oviducts, Uterus, and Cervix of Mated Ewe as Affected by Exogenous Estradiol." Journal of Animal Science **46**(5): 1300-1308.

Hawk, H. W. and Cooper, B. S. (1975). "Improvement of Sperm Transport by Administration of Estradiol to Estrous Ewes." Journal of Animal Science **41**(5): 1400-1406.

Hess, R. A., Bunick, D., Lee, K. H., Bahr, J., Taylor, J. A., Korach, K. S. and Lubahn, D. B. (1997). "A role for oestrogens in the male reproductive system." Nature **390**(6659): 509-512.

Hunter, R. H. F. (1988). Transport of gametes, selection of spermatozoa and gamete lifespan in the female tract. The Fallopian Tubes, their Role in Fertility and Infertility. R. H. F. Hunter. New York, Springer Verlag.: 53-80.

Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972). "Apoptosis - Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics." British Journal of Cancer **26**(4): 239-&.

Kierszenbaum, A. L. (2001). "Apoptosis during spermatogenesis: The thrill of being alive." Molecular Reproduction and Development **58**(1): 1-3.

Korach, K. S., Couse, J. F., Curtis, S. W., Washburn, T. F., Lindzey, J., Kimbro, K. S., Eddy, E. M., Migliaccio, S., Snedeker, S. M., Lubahn, D. B., Schomberg, D. W. and Smith, E. P. (1996). "Estrogen receptor gene disruption: Molecular characterization and experimental and clinical phenotypes." Recent Progress in Hormone Research, Vol 51 **51**: 159-188.

Kurz, A., Viertel, D., Herrmann, A. and Muller, K. (2005). "Localization of phosphatidylserine in boar sperm cell membranes during capacitation and acrosome reaction." Reproduction **130**(5): 615-626.

Lishko, P. V., Botchkina, I. L. and Kirichok, Y. (2011). "Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm." Nature **471**(7338): 387-391.

Lockshin, R. A. and Williams, C. M. (1964). "Programmed Cell Death .2. Endocrine Potentiation of the Breakdown of the Intersegmental Muscles of Silkmoths." Journal of Insect Physiology **10**(4): 643-649.

Luconi, M., Forti, G. and Baldi, E. (2002). "Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction." Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **80**(4-5): 369-381.

Luconi, M., Muratori, M., Forti, G. and Baldi, E. (1999). "Identification and characterization of a novel functional estrogen receptor on human sperm membrane that interferes with progesterone effects." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **84**(5): 1670-1678.

Lukoseviciute, K., Zilinskas, H. and Januskauskas, A. (2004). "Effect of exogenous progesterone on post-thaw capacitation and acrosome reaction of bovine spermatozoa." Reproduction in Domestic Animals **39**(3): 154-161.

Marti, E., Perez-Pe, R., Colas, C., Muino-Blanco, T. and Cebrian-Perez, J. A. (2008). "Study of apoptosis-related markers in ram spermatozoa." Animal Reproduction Science **106**(1-2): 113-132.

Mohamed, E. S., Park, Y. J., Song, W. H., Shin, D. H., You, Y. A., Ryu, B. Y. and Pang, M. G. (2011). "Xenoestrogenic compounds promote capacitation and an acrosome reaction in porcine sperm." Theriogenology **75**(6): 1161-1169.

Muratori, M., Luconi, M., Marchiani, S., Forti, G. and Baldi, E. (2009). "Molecular markers of human sperm functions." International Journal of Andrology **32**(1): 25-45.

Muratori, M., Porazzi, I., Luconi, M., Marchiani, S., Forti, G. and Baldi, E. (2004). "Annexin V binding and merocyanine staining fail to detect human sperm capacitation." Journal of Andrology **25**(5): 797-810.

Oehninger, S., Sueldo, C., Lanzendorf, S., Mahony, M., Burkman, L. J., Alexander, N. J. and Hodgen, G. D. (1994). "A Sequential-Analysis of the Effect of Progesterone on Specific Sperm Functions Crucial to Fertilization in-Vitro in Infertile Patients." Human Reproduction **9**(7): 1322-1327.

Ollero, M., Blanco, T. M., LopezPerez, M. J. and Perez, J. A. C. (1996). "Surface changes associated with ram sperm cryopreservation revealed by counter-current distribution in an aqueous two-phase system - Effect of different cryoprotectants." Journal of Chromatography B-Biomedical Applications **680**(1-2): 157-164.

Ollero, M., MuinoBlanco, T., LopezPerez, M. J. and CebrianPerez, J. A. (1996). "Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations." International Journal of Andrology **19**(5): 287-292.

Ollero, M., Pascual, M. L., Muinoblanco, T., Cebrianperez, J. A. and Lopezperez, M. J. (1994). "Revealing Surface Changes Associated with Maturation of Ram Spermatozoa by Centrifugal

Countercurrent Distribution in an Aqueous 2-Phase System." Journal of Chromatography A **668**(1): 173-178.

Osman, R. A., Andria, M. L., Jones, A. D. and Meizel, S. (1989). "Steroid Induced Exocytosis - the Human-Sperm Acrosome Reaction." Biochemical and Biophysical Research Communications **160**(2): 828-833.

Quinn, P., Kerin, J. F. and Warnes, G. M. (1985). "Improved Pregnancy Rate in Human Invitro Fertilization with the Use of a Medium Based on the Composition of Human Tubal Fluid." Fertility and Sterility **44**(4): 493-498.

Rodriguez, I., Ody, C., Araki, K., Garcia, I. and Vassalli, P. (1997). "An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis." Embo Journal **16**(9): 2262-2270.

Said, T. M., Agarwal, A., Grunewald, S., Rasch, M., Glander, H. J. and Paasch, U. (2006). "Evaluation of sperm recovery following annexin V magnetic-activated cell sorting separation." Reproductive Biomedicine Online **13**(3): 336-339.

Sebkova, N., Cerna, M., Ded, L., Peknicova, J. and Dvorakova-Hortova, K. (2012). "The slower the better: how sperm capacitation and acrosome reaction is modified in the presence of estrogens." Reproduction **143**(3): 297-307.

Taylor, S. L., Weng, S. L., Fox, P., Duran, E. H., Morshedi, M. S., Oehninger, S. and Beebe, S. J. (2004). "Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality." Molecular Human Reproduction **10**(11): 825-834.

Tulsiani, D. R., Zeng, H. T. and Abou-Haila, A. (2007). "Biology of sperm capacitation: evidence for multiple signalling pathways." Soc Reprod Fertil Suppl **63**: 257-272.

Uhler, M. L., Leung, A., Chan, S. Y. W. and Wang, C. (1992). "Direct Effects of Progesterone and Antiprogestosterone on Human Sperm Hyperactivated Motility and Acrosome Reaction." Fertility and Sterility **58**(6): 1191-1198.

Vigil, P., Toro, A. and Godoy, A. (2008). "Physiological action of oestradiol on the acrosome reaction in human spermatozoa." Andrologia **40**(3): 146-151.

Villaverde, A. I. S. B., Fioratti, E. G., Landim-Alvarenga, F. C., Balieiro, J. C. D., Melo, C. M., Papa, F. O. and Lopes, M. D. (2009). "Effect of Progesterone and Ionomycin on Domestic Cat Sperm Motility Patterns and Acrosome Reaction." Reproduction in Domestic Animals **44**: 309-312.

Wyllie, A. H., Kerr, J. F. and Currie, A. R. (1980). "Cell death: the significance of apoptosis." Int Rev Cytol **68**: 251-306.

9. ANEXOS

9.1. Abreviaturas

ANGRA	Asociación Nacional de Ganaderos de Rasa Aragonesa
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CASA	Computer-assisted sperm analysis
CFDA	Diacetato de carboxifluoresceína
CTC	Clorotetraciclina
DMSO	Dimetil sulfóxido
Dx	Dextrano
E ₂	17-β estradiol
EGTA	Ácido tetraacético de etilenglicol
EthD	Homodímero de etídio
FADO	Formaldehído
IP	Ioduro de propidio
ISAS	Integrated Semen Analysis System
P4	Progesterona
SAEA	Servicio de Apoyo a la Experimentación Animal