



**Universidad
Zaragoza**



**Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza**



Estudio de la posible acción protectora de la melatonina frente al daño por frío en espermatozoides ovinos

Trabajo Fin de Grado

Autora:

Sara Miguel Jiménez

Directores:

**Rosaura Pérez Pé
José Álvaro Cebrián Pérez**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular
Grado de Biotecnología**

Septiembre 2015



Universidad
Zaragoza



La Dra. Rosaura Pérez Pé, Profesora Titular y el Dr. José Álvaro Cebrián Pérez, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza

INFORMAN:

Que la alumna Dña. Sara Miguel Jiménez, ha realizado bajo nuestra dirección, en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, su Trabajo Fin de Grado titulado "Estudio de la posible acción protectora de la melatonina frente al daño por frío en espermatozoides ovinos". Este trabajo cumple los objetivos recogidos en las Directrices TFG en Biotecnología, por lo que consideran procedente su presentación.

Y para que conste a los efectos oportunos firman la presente en Zaragoza a 16 de septiembre de 2015.

Rosaura Pérez Pé

José Álvaro Cebrián Pérez

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. INSEMINACIÓN EN ESPECIE OVINA: REFRIGERACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	3
2.2. APOPTOSIS EN ESPERMATOZOIDES	5
2.3. MELATONINA Y SU PAPEL FISIOLÓGICO EN LA REPRODUCCIÓN	6
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
4.1. PROCESADO DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS	8
4.1.1. Obtención de las muestras seminales.....	8
4.1.2. Método de <i>swim-up</i> / <i>dextrano</i>	8
4.1.3. Refrigeración de las muestras	9
4.1.4. Valoración del efecto de la melatonina	9
4.2. EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS.....	10
4.2.1. Cálculo de la concentración espermática.....	10
4.2.2. Análisis de la motilidad espermática.....	10
4.2.2.1. Evaluación de la hiperactivación espermática	10
4.2.3. Evaluación de la integridad de la membrana plasmática.....	11
4.2.4. Determinación del estado de capacitación	12
4.2.4.1. Tinción con clorotetraciclina	12
4.2.4.2. Detección de la fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas de membrana espermáticas.....	12
4.2.5. Determinación de parámetros apoptóticos	13
4.2.5.1. Determinación de la inversión de fosfatidilserina.....	13
4.2.5.2. Detección de daño en el ADN.....	14
4.2.5.3. Determinación de la actividad caspasa	15
4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
5.1. ANÁLISIS COMPARATIVO DEL EFECTO DE DISTINTOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS DE DESCENSO DE TEMPERATURA SOBRE LA FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA.....	16
5.2. EFECTO DE LA ADICIÓN PREVIA DE DIFERENTES DOSIS DE MELATONINA SOBRE ESPERMATOZOIDES SOMETIDOS A REFRIGERACIÓN.....	17
6. CONCLUSIONES.....	22
CONCLUSIONS	22
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

1. RESUMEN

Las dosis seminales ovinas se suelen refrigerar para su uso a corto plazo en inseminación artificial. Los espermatozoides de la especie ovina son especialmente susceptibles al frío, y su exposición a bajas temperaturas produce una serie de cambios entre los que se incluyen pérdida de motilidad, de integridad de membrana, aumento de marcadores apoptóticos y una capacitación prematura o criocapitación. La capacitación es un proceso complejo por el cual los espermatozoides adquieren capacidad fecundante, pero si esta se produce lejos del ovocito, el espermatozoide no será capaz de cumplir su misión, por lo que una capacitación prematura consecuencia del frío resulta indeseable.

La melatonina es una hormona importante en la regulación de la reproducción. El descubrimiento de la presencia de receptores para esta hormona en la superficie del espermatozoide ovino, indicaría una acción directa de la misma sobre la funcionalidad de estas células. Algunas de las rutas moleculares a través de las que actúa la melatonina en algunas células somáticas también están implicadas en la regulación de procesos fisiológicos del espermatozoide, como la capacitación. Además, también se atribuye un papel protector frente a la apoptosis en algunos tipos celulares. Por ello, en el presente trabajo se planteó la hipótesis de que la melatonina podría tener un efecto de protección frente al frío en espermatozoides, evitando los cambios relacionados con la criocapitación y el aumento de marcadores apoptóticos.

El objetivo de este estudio fue estudiar el efecto de diferentes concentraciones de melatonina añadidas a los espermatozoides antes de ser sometidos a bajas temperaturas, analizando distintos parámetros relacionados con la funcionalidad espermática: motilidad, integridad de membrana, estado de capacitación (relacionado con la distribución del calcio intracelular y la fosforilación de tirosinas de proteínas de membrana) y marcadores apoptóticos.

Los resultados obtenidos indican que la refrigeración directa a 5 °C, aunque no afecta a la motilidad espermática, produce efectos subletales sobre los espermatozoides reflejándose en una disminución importante del resto de parámetros de calidad seminal. Las dosis de melatonina utilizadas (100 pM, 10 nM y 1 µM) no mejoran de manera significativa los valores de motilidad e integridad de membrana, pero sí disminuye significativamente el porcentaje de espermatozoides capacitados si se incuba la muestra con las dosis de 100 pM y 10 nM previamente a la refrigeración. La melatonina, a dosis bajas (100 pM), disminuye el porcentaje de espermatozoides con marcadores apoptóticos como la inversión de fosfatidilserina y la actividad de caspasas, si bien este descenso no es significativo.

En conclusión, en este estudio se demuestra que la melatonina es capaz de evitar, al menos parcialmente, la capacitación prematura asociada a frío.

ABSTRACT

Ovine seminal doses are usually cooled for short-term use in artificial insemination. Ram sperm is particularly susceptible to cold-shock, and their exposure to low temperatures produce many changes including loss of motility and membrane integrity, increment on apoptotic markers and premature capacitation, known as cryocapacitation. Capacitation is a complex process by which sperm acquires fertilizing capacity, but if it occurs far away from the oocyte, the sperm will not be able to successfully achieve its mission, so that premature capacitation is undesirable.

Melatonin is an important hormone involved in the regulation of reproduction. Discovery of receptors for this hormone on the surface of ram spermatozoa would indicate a direct action on the functionality of these cells. Some of the molecular pathways through melatonin acts in some somatic cells are also involved in regulating physiological processes of sperm, such as capacitation. Melatonin also confers protection against apoptosis in some types of cells. Therefore, this study raises the hypothesis that melatonin could have a protective effect against cold-shock in ram spermatozoa avoiding changes related to cryocapacitation and the increase of apoptosis markers.

The aim of this study was to investigate the effect of different doses of melatonin added to sperm before being refrigerated, by analyzing parameters related to sperm functionality: motility, membrane integrity, capacitation state (related to intracellular calcium distribution and tyrosine phosphorylation of membrane proteins) and apoptotic markers.

The obtained results indicate that direct cooling to 5 °C does not affect sperm motility, but produces sublethal effects on sperm, as reflected in a significant decrease in other seminal quality parameters. Melatonin, at doses used in this study (100 pM, 10 nM and 1 µM) do not improve significantly the motility and membrane integrity values, but it reduces the percentage of capacitated sperm, if the sample is incubated with low an intermediate concentration of melatonin (100 pM and 10 nM) before to cooling. Moreover, melatonin, at low doses (100 pM), decreases the percentage of sperm with apoptotic markers as phosphatidylserine translocation and caspase activity, although this decrease is not significant statistically.

In conclusion, this study shows that melatonin is able to avoid, at least partially, premature cold-associated capacitation.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. INSEMINACIÓN EN ESPECIE OVINA: REFRIGERACIÓN DE LAS MUESTRAS SEMINALES

La inseminación artificial (IA) es una de las herramientas que más ha contribuido al avance de la producción animal. Mediante la IA, un eyaculado de un animal de alto valor genético puede usarse para inseminar a gran cantidad de hembras y, además, se evita la propagación de enfermedades de transmisión sexual. Sin embargo, la inseminación artificial en la especie ovina no está ampliamente difundida debido principalmente a los bajos resultados de fertilidad obtenidos con semen refrigerado o congelado.

En ovino, las dosis normalmente utilizadas en inseminación artificial son refrigeradas a 15 °C, lo que permite el mantenimiento del semen durante unas 6 horas y así poder exportarlo a granjas distantes. La refrigeración se basa en la prolongación de la capacidad fecundante al reducir la motilidad y el metabolismo de los espermatozoides de forma reversible. Sin embargo, este descenso controlado de temperatura de las muestras seminales para la inseminación artificial hace que la tasa de fertilidad obtenida no sea buena (alrededor del 50 %), a diferencia de otras especies, donde esta técnica es altamente utilizada y con un gran porcentaje de éxito. Esto parece ser debido, entre otras causas, a la complicada estructura cervical del útero ovino, que dificulta la deposición del semen de forma profunda en el tracto genital femenino, y a la especial susceptibilidad al frío de los espermatozoides ovinos en comparación con los de otras especies que posibilitan que las dosis seminales se refrigieren o congelen sin problema.

El descenso rápido de la temperatura, de 30 a 5 °C, conocido como choque térmico o *cold-shock*, produce en los espermatozoides una serie de efectos negativos proporcionales a la velocidad de enfriamiento, el intervalo de temperatura y el rango de temperatura (Watson, 1981). La susceptibilidad de las distintas especies a estos daños por *cold-shock* es diferente y está determinada por la relación de colesterol y fosfolípidos de la membrana plasmática. En el caso de la especie ovina esta relación es muy baja (los espermatozoides tienen poco colesterol en la membrana), lo que hace que sean muy sensibles a las bajas temperaturas. Los efectos negativos desencadenados por el *cold-shock* pueden ser:

- a) Alteraciones estructurales. Se produce una desorganización de la membrana plasmática, formándose vesículas híbridas entre la membrana acrosomal y la membrana plasmática, o incluso la destrucción de la membrana del acrosoma, como versión desorganizada de la reacción acrosómica que sufre el espermatozoide justo antes de fecundar al ovocito. Esto se debe a que los fosfolípidos de membrana disminuyen tras la refrigeración, se pierde fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (Alvarez and Storey, 1992), al mismo tiempo que se da una inversión de fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana, lo que provoca inestabilidad y asimetría fosfolipídica (Muller *et al.*, 1999). Los cambios en la membrana fosfolipídica también afectan a las proteínas que se albergan en ella, que pierden su función y contribuyen a que la membrana se torne más fluida y permeable (Robertson and Watson, 1986). Además se produce peroxidación lipídica en la membrana debido a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, como se explica más adelante (Alvarez and Storey, 1992).

INTRODUCCIÓN

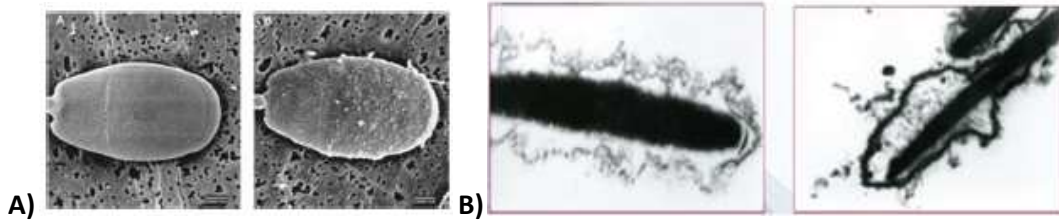


Figura 1. A) Microscopía electrónica de barrido de un espermatozoide ovino (Barrios *et al.*, 2000). Izquierda: espermatozoide obtenido de la muestra seleccionada (*swim-up*); derecha: espermatozoide sometido a *cold-shock*. **B)** Micrografía electrónica de transmisión de un espermatozoide ovino sometido a *cold-shock* (Colas *et al.*, 2009).

- b) Deterioro de la motilidad. Debido a cambios en el transporte activo y en la permeabilidad de la membrana plasmática a nivel del flagelo, así como en la disponibilidad de energía. Esto explicaría parcialmente la baja fertilidad obtenida con el semen refrigerado.
- c) Daño oxidativo. La criopreservación induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por acumulo de productos tóxicos del metabolismo, perjudiciales para el espermatozoide (Alvarez and Storey, 1992) y para el DNA (Irvine *et al.*, 2000). La existencia de ROS provoca disminución de la motilidad y viabilidad, de la integridad acrosomal y del potencial de membrana mitocondrial (Baumber *et al.*, 2000). Además, los espermatozoides dañados o defectuosos generan también grandes cantidades de ROS (Ball *et al.*, 2001).
- d) Cambios semejantes a los del proceso de capacitación (criocapacitación). La capacitación espermática es un proceso que ocurre fisiológicamente cuando el espermatozoide atraviesa el tracto reproductor femenino (en el tramo final del útero o en el oviducto) y es necesaria para que éste adquiera la capacidad de fecundar al ovocito (Yanagimachi, 1994). Algunos espermatozoides sometidos a enfriamiento y recalentamiento posterior se comportan como espermatozoides capacitados. Este hecho se asocia a las modificaciones y reorganización en la membrana de la cabeza del espermatozoide debido a la redistribución de fosfolípidos y a la salida de colesterol (Langlais *et al.*, 1981) que los hace más reactivos y quedan en un estado parcialmente capacitado (Watson, 1995). Este proceso se denomina criocapacitación y llevará a los espermatozoides a experimentar la reacción acrosómica lejos todavía del ovocito. Pero los mecanismos por los que se produce la criocapacitación todavía no están elucidados, ya que son más complicados que los del proceso normal de capacitación, el cual todavía no se conoce completamente.

La capacitación espermática implica una serie secuencial de profundos cambios bioquímicos y biofísicos (Yanagimachi, 1994):

- Incremento de la fluidez de la membrana plasmática por salida de colesterol e hiperpolarización de la misma (Zeng *et al.*, 1995). La disminución de la relación colesterol/fosfolípidos de membrana parece facilitar el influjo de calcio en el espermatozoide (Davis *et al.*, 1979), que desencadenará la reacción acrosómica (Roldan and Harrison, 1989).
- Alcalinización del medio intracelular (Zeng *et al.*, 1996).
- En la mayoría de las especies se ha observado un incremento de calcio intracelular durante la capacitación (Baldi *et al.*, 1991). Este incremento puede ser debido a la entrada de calcio desde el exterior o a la salida del mismo desde los reservorios intracelulares.

- Cambio en el patrón de la motilidad (Katz and Yanagimachi, 1981). Se producen cambios conformacionales en las proteínas del axonema del flagelo, de manera que éste se torna más flexible. Esto permite la hiperactivación de la motilidad espermática gracias al aumento del desplazamiento lateral de cabeza y la disminución de la frecuencia de batida del flagelo. Así el espermatozoide pasa de tener un movimiento rectilíneo a un patrón de movimiento de penetración, lo que le permite de manera fisiológica buscar al ovocito para fecundarlo.
 - Fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, requisito para que el espermatozoide pueda fecundar al ovocito (Visconti *et al.*, 1995), ya que ocurre en las etapas tardías de la capacitación. Este proceso fue descrito en ovino por primera vez por el grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo el presente trabajo (Perez-Pe *et al.*, 2002) y posteriormente se demostró la participación de nuevas vías alternativas de señalización que lo regulan (Luna *et al.*, 2012). La fosforilación de tirosinas se da en proteínas de la cabeza y del flagelo del espermatozoide. La presencia de fosfotirosinas en las proteínas de cabeza contribuyen al aumento de la fluidez de la membrana plasmática por salida del colesterol, mientras las fosfotirosinas en proteínas del flagelo ayudan al cambio en la motilidad del espermatozoide.
 - Preparación para experimentar la reacción acrosómica. Este evento sólo pueden experimentarlo espermatozoides previamente capacitados (Saling *et al.*, 1979). Consiste en la exocitosis controlada de sustancias (principalmente enzimas) del acrosoma para permitir al espermatozoide penetrar en la zona pelúcida del ovocito y realizar la fecundación con éxito.
- e) Aumento de marcadores apoptóticos. El descenso y el posterior incremento de temperatura implican un aumento de estos marcadores (Del Valle *et al.*, 2010) que podrían explicar, en parte, el daño producido en los espermatozoides ovinos por la refrigeración.

2.2. APOPTOSIS EN ESPERMATOZOIDES

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso de autodestrucción celular controlado. Este fenómeno ha sido estudiado en profundidad en células somáticas, pero no tanto en espermatozoides. Se produce apoptosis durante la espermatogénesis como proceso homeostático y para eliminar células germinativas defectuosas. Sin embargo, también se observan células apoptóticas en el eyaculado. Algunos autores lo atribuyen a la existencia de espermatozoides inmaduros (Paasch *et al.*, 2004), otros a un fenómeno de apoptosis testicular abortiva (Sakkas *et al.*, 2004), y algunos a causas patológicas (Oehninger *et al.*, 2003). Otra teoría avalada por muchos autores y que cobra fuerza hoy en día establece que los espermatozoides maduros una vez eyaculados son capaces de iniciar y completar el proceso de apoptosis (Anzar *et al.*, 2002; Marti *et al.*, 2008). Es lógico pensar que los espermatozoides en el tracto reproductor femenino, tras la finalización de su tiempo de vida inherente, o al no alcanzar el ovocito y no llevar a cabo la función para la que han sido generados, se eliminasen por un proceso apoptótico, ya que de esta manera su destrucción no produciría ningún efecto perjudicial en el tracto reproductor femenino ni en el resto de espermatozoides ni células circundantes (Eisenbach, 2003). Además, la apoptosis en los espermatozoides se activaría como un mecanismo de eliminación de las células anormales, y/o en respuesta al estrés ambiental. Así, algunos autores han descrito ciertas características de los espermatozoides sometidos a la acción del frío semejantes a las descritas en el fenómeno de apoptosis (Martin *et al.*, 2004). Cualquiera que sea la causa, la presencia de espermatozoides con

características apoptóticas en las dosis seminales podría ser una de las razones para la baja fertilidad, como se ha visto en la especie humana (Said *et al.*, 2006), en toro (Anzar *et al.*, 2002) y en morueco (Marti *et al.*, 2008).

El análisis de los marcadores apoptóticos se basa en la detección de los cambios que se producen. Parte de los espermatozoides eyaculados presentan evidencias de estos marcadores, como fragmentación del ADN (Barroso *et al.*, 2000), translocación de fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática (Duru *et al.*, 2001), y actividad de caspasas que median el proceso apoptótico (Weng *et al.*, 2002).

2.3. MELATONINA Y SU PAPEL FISIOLÓGICO EN LA REPRODUCCIÓN

En la especie ovina la reproducción tiene un carácter estacional muy marcado, caracterizado por la alternancia de un periodo no reproductivo en primavera y verano, y de un periodo de actividad reproductiva en otoño e invierno. Dacheux y col. observaron que la producción de espermatozoides en moruecos era cuatro veces más elevada en otoño (septiembre) que en invierno (febrero) (Dacheux *et al.*, 1981).

La estacionalidad reproductiva en el ovino está regida por la secreción de melatonina. Es la glándula pineal, a través de la secreción de la melatonina, la que traduce los estímulos luminosos en hormonales (Bittman *et al.*, 1983). Ebling y Hastings presentaron las bases de este proceso (Ebling and Hastings, 1992), indicando que la luz percibida por la retina regula la secreción de melatonina y que ésta es proporcional a la duración de la noche, por tanto, su ritmo de producción se modifica a lo largo del año en función de la duración de los días, siendo su secreción más larga durante los días cortos de otoño e invierno. La melatonina modula la síntesis y secreción de hormonas gonadotrópicas en el hipotálamo (Bittman *et al.*, 1983).

Esta hormona, además de en la glándula pineal, es sintetizada en varios tejidos, como el tracto gastro-intestinal, el ojo, la piel, el tracto reproductor femenino, y, como ha demostrado recientemente nuestro grupo de investigación, también en los tejidos del tracto reproductor masculino (González-Arto *et al.*, 2014). El mecanismo de acción de la melatonina es muy complejo y está implicada, además de en la regulación de los ciclos reproductivos que se ha mencionado anteriormente, en multitud de procesos fisiológicos y fisiopatológicos, como el sueño, el cáncer y la respuesta inmune. Además tiene una clara acción antioxidante, evitando el daño oxidativo en macromoléculas, células, tejidos y órganos. También se le asigna a la melatonina el papel de importante modulador del citoesqueleto y de sustancia quimioatrayente en algunos tipos celulares.

Hay que destacar que esta hormona está presente en el plasma seminal y es capaz de ejercer efectos directos sobre los espermatozoides ovinos, algunos de ellos mediados por su unión a receptores específicos presentes en la superficie de estas células (Casao *et al.*, 2012; Gonzalez-Arto *et al.*, 2014). Nuestro grupo de investigación demostró por primera vez los efectos beneficiosos de la melatonina exógena sobre los espermatozoides ovinos, incluyendo la disminución de los marcadores apoptóticos, así como el aumento del porcentaje de oocitos fertilizados *in vitro* con los espermatozoides tratados (Casao *et al.*, 2010; Casao *et al.*, 2013). Algunas de las rutas moleculares a través de las que actúa la melatonina en algunas células somáticas también están implicadas en la regulación de procesos fisiológicos del espermatozoide, como la capacitación.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A la vista de los antecedentes expuestos, la **hipótesis** que se plantea en este trabajo es que la melatonina puede evitar o disminuir los efectos nocivos que produce el frío en los espermatozoides ovinos, evitando los cambios relacionados con la criocapacitación y el aumento de marcadores apoptóticos, y ejerciendo así un papel crioprotector.

El **objetivo principal** de este trabajo fue el de estudiar el efecto que tiene la melatonina exógena sobre los espermatozoides ovinos sometidos a la acción del frío. Pero previamente hubo que seleccionar el tratamiento térmico más adecuado que permitiese evidenciar claramente la mayoría de los daños asociados al frío. Así, se plantearon dos **objetivos parciales**:

1. Análisis comparativo de las alteraciones que producen en los espermatozoides ovinos diferentes tratamientos térmicos de descenso de temperatura, con el fin de seleccionar el más adecuado para el desarrollo del objetivo principal del trabajo. Estos tratamientos fueron:
 - Refrigeración progresiva controlada desde 25 °C hasta 15 ó hasta 5 °C.
 - Incubación directa a 15 °C durante 30 minutos, o a 5 °C durante 10 minutos.
2. Estudio del efecto de diferentes dosis de melatonina añadidas a los espermatozoides ovinos antes de ser sometidos a una bajada brusca de temperatura a 5 °C. En concreto se evaluó:
 - La motilidad espermática y parámetros cinéticos relacionados con la hiperactivación flagelar que puede producirse como consecuencia de la exposición a bajas temperaturas.
 - La integridad de la membrana plasmática.
 - El estado de capacitación espermática en función de la distribución intracelular del calcio.
 - La fosforilación en residuos de tirosina de las proteínas espermáticas como comprobación del estado de capacitación.
 - Marcadores apoptóticos, en base a los cambios que se producen en membrana (inversión de fosfatidilserina), citoplasma (activación de caspasas) y núcleo (fragmentación del ADN).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. PROCESADO DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS

4.1.1. Obtención de las muestras seminales

El semen utilizado para los experimentos fue obtenido a partir de moruecos adultos de entre 2 y 6 años de edad, pertenecientes a la Asociación Nacional de Ganaderos de la raza *Rasa Aragonesa* (ANGRA), estabulados en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Zaragoza. Tanto el mantenimiento de los sementales como la obtención de las muestras corrieron a cargo del personal del SEA. Los animales se mantuvieron con un régimen de tres extracciones semanales, lo que implica periodos de abstinencia de dos o tres días. Se obtuvieron dos eyaculados consecutivos por morueco, mediante vagina artificial, y se utilizaron sólo los segundos en base a resultados previos que demostraron que éstos tenían mejores parámetros de calidad (Ollero *et al.*, 1996). Tras la recogida, las muestras se mantuvieron a 37 °C hasta su uso y se trabajó con la mezcla de los segundos eyaculados para evitar diferencias individuales.

4.1.2. Método de *swim-up* /*dextrano*

Con el fin de eliminar el plasma seminal y/o restos celulares de las muestras frescas, se utilizó el método de *swim-up/dextrano*. La eliminación del plasma seminal resulta conveniente debido al efecto perjudicial que éste ejerce en el mantenimiento de las células espermáticas (Mortimer, 1994), así como para evitar la influencia de sus componentes en los resultados obtenidos.

El método de *swim-up/dextrano* puesto a punto en nuestro laboratorio por García- López y col. (García-López *et al.*, 1996) está basado en el descrito por Álvarez para espermatozoides humanos (Álvarez *et al.*, 1993), pero se modificaron tanto alguno de los pasos del proceso como la composición del medio para su aplicación en el lavado de espermatozoides ovinos. Además, dado que la centrifugación resulta nociva para los espermatozoides ovinos, el método no incluye centrifugación (Fig. 2). Esta técnica no es un simple método de lavado, ya que además de la eliminación del plasma seminal, permite obtener una población celular enriquecida en espermatozoides altamente móviles y viables.

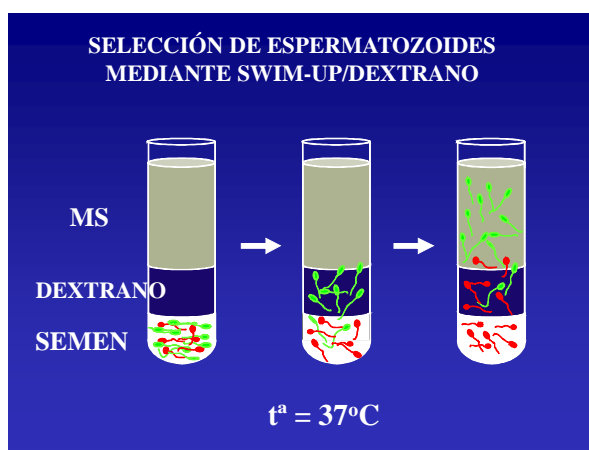


Figura 2. Esquema del método de selección de espermatozoides mediante *swim-up/dextrano*.

La composición del medio utilizado para el *swim-up* (MS) fue la siguiente: NaCl 50 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 4mM, K₂HPO₄ 0,3 mM, HEPES 21 mM, glucosa 2,8 mM, piruvato sódico 0,33 mM, lactato sódico 18,6 mM y sacarosa 200 mM. El pH se ajustó a 6,5 y se le añadieron 1,5 UI/ml de penicilina y 15 µg/ml de estreptomicina para evitar su contaminación.

En este trabajo se modificaron ligeramente las cantidades, tanto de muestra seminal, como de medio, para obtener una muestra seleccionada más concentrada que la resultante del proceso de *swim-up/dextrano* realizado habitualmente en nuestro laboratorio (García-López *et al.*, 1996). Se colocaron cuidadosamente 750 μ l de semen en el fondo de un tubo redondeado de 15 mm de diámetro y sobre él se depositaron 500 μ l de MS-Dx (30 mg Dextrano/ml MS). Esta capa con alta concentración de dextrano actúa como barrera física impidiendo el paso de espermatozoides con baja motilidad, y además retiene a aquellos con ciertas alteraciones en su membrana. Sobre esta capa de MS-Dx se añadió muy lentamente 1 ml de MS-A (5 mg albúmina sérica bovina (BSA)/ml MS). La inclusión de BSA en esta capa superior evita la aglutinación espermática. Se dejó incubar a 37 °C en posición vertical durante 15 minutos y se retiraron 500 μ l de fase superior que se designó como primer sobrenadante y seguidamente se añadieron otros 500 μ l de MS-A. El proceso se repitió otras tres veces consecutivas recogiendo un total de cuatro sobrenadantes. Se desechó el primero por contener restos de plasma seminal, y se trabajó posteriormente con la mezcla de los tres restantes.

4.1.3. Refrigeración de las muestras

Para estudiar una posible acción protectora de la melatonina frente al frío sobre los espermatozoides, previamente se realizó un análisis comparativo de los efectos de distintos tratamientos térmicos sobre dichas células. En concreto se llevó a cabo una refrigeración a 15 °C y otra a 5 °C utilizando un baño termostatzado que permite una bajada controlada de la temperatura (-0,2 °C/min). Se realizaron también tratamientos incubando directamente las muestras a 15 ó 5 °C, con una bajada más brusca de temperatura, que finalmente fue el tratamiento empleado para desarrollar el objetivo principal del trabajo.

Refrigeración controlada: las muestras se mantuvieron durante media hora a 25 °C y después, utilizando un baño termostatzado que permite programar una rampa de temperatura (RT), se refrigeraron con un descenso de -0,2 °C/min hasta llegar a los 15 °C de temperatura. El mismo tratamiento se realizó prolongando hasta los 5 °C.

Refrigeración directa: Se realizaron dos tipos de tratamiento, ambos se iniciaron con el mantenimiento de las muestras a 25 °C durante media hora.

- Tratamiento a 15 °C durante 30 minutos.
- Tratamiento a 5 °C en baño de hielo durante 10 minutos.

La nomenclatura que se utilizará a lo largo de todo el trabajo será **15 °C RT** y **5 °C RT** para la bajada controlada de temperatura, y **15 °C** ó **5 °C** para la bajada brusca.

4.1.4. Valoración del efecto de la melatonina

Las muestras obtenidas tras el *swim-up* se incubaron con melatonina previamente a la refrigeración directa a 5 °C. La melatonina se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) y PBS y se añadió a las muestras para conseguir unas concentraciones finales de 100 pM, 10 nM y 1 μ M, respectivamente. La concentración final de DMSO en todas las muestras fue del 0,1 %. También se sometió a esta refrigeración a un grupo control incubado con la misma concentración de DMSO para tener en cuenta un posible efecto tóxico de dicho compuesto, si bien, a tan baja concentración no se ha descrito daño para los espermatozoides. Este diseño experimental planteado se muestra en la Figura 3.

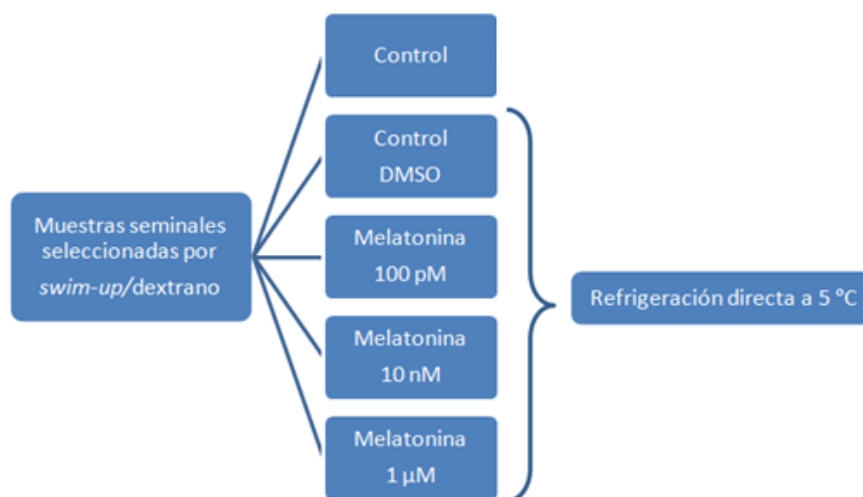


Figura 3. Diseño del experimento principal de este trabajo.

4.2. EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS

4.2.1. Cálculo de la concentración espermática

La determinación de la concentración de las muestras espermáticas obtenidas tras el *swim-up* se calculó por duplicado usando una cámara de Neubauer (Marienfeld, Germany), tras una dilución 1/100 con agua. Se colocó una gota de 6 μ l en la cámara y se observó con objetivo 10x en un microscopio de contraste de fases. Se contaron las células existentes en 16 cuadrículas de la cámara y se aplicó la fórmula:

$$C = n^{\circ} \text{ espermatozoides contados} \times 10^4 \text{ ml} \times \frac{1}{\text{dilución}} = \text{espermatozoides/ml}$$

4.2.2. Análisis de la motilidad espermática

La determinación de la motilidad espermática se realizó utilizando un sistema automatizado de análisis espermático conectado a un ordenador (CASA, *computer assisted semen analysis*), concretamente el ISAS 1.0.4 (*Integrated Semen Analysis System*. Proiser SL, Valencia, España). Las muestras obtenidas tras el *swim-up* se diluyeron 1:10 en medio bifase compuesto por sacarosa 0,25 M, EGTA 0,1 mM, fosfato sódico 4 mM, y tampón HEPES 10X (Glucosa 50 mM, HEPES 100 mM, KOH 20 mM) 10 % (v/v).

Se colocó una gota de la dilución en un portaobjetos y se observó con objetivo 10x en un microscopio con contraste de fases, a través de un monitor de ordenador, utilizando el programa ISAS. Se analizaron al menos cinco campos por gota y un mínimo de dos gotas por muestra. El programa es capaz de integrar las imágenes captadas mostrando la trayectoria de los espermatozoides y clasificándolos en función de su movimiento en estáticos y móviles (lentos, medios y rápidos). Además proporciona valores de motilidad total (MT) (% de espermatozoides móviles) y motilidad progresiva (MP) (% de espermatozoides que se mueven siguiendo una trayectoria recta), así como numerosos parámetros cinéticos, algunos de ellos descritos en el apartado siguiente.

4.2.2.1. Evaluación de la hiperactivación espermática

Para profundizar más en los cambios en el patrón de movimiento asociados con el frío se decidió analizar, usando igualmente la información proporcionada por el programa CASA, el porcentaje de espermatozoides hiperactivados. La hiperactivación flagelar es un cambio en el patrón

de movimiento caracterizado por una menor linealidad y una mayor amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza que proporciona una mayor posibilidad de interacción con el ovocito.

Se determinó el porcentaje de espermatozoides hiperactivados en las diferentes muestras espermáticas al finalizar el *swim-up*, y tras refrigerar las muestras sin (control) y con diferentes dosis de melatonina (100 pM, 10 nM, 1 μM). Se realizó teniendo en cuenta dos parámetros cinéticos de los espermatozoides móviles en base a resultados previos de nuestro grupo de investigación (Colas *et al.*, 2010): LIN (índice de linealidad) y ALH (amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza). Los espermatozoides se consideraron hiperactivados cuando mostraron un valor de LIN $\leq 45\%$ y de ALH $\geq 3,5\ \mu\text{m}$.

4.2.3. Evaluación de la integridad de la membrana plasmática

La integridad de la membrana espermática se valoró mediante el método descrito por Harrison and Vickers (Harrison and Vickers, 1990), conocido como método del yoduro de propidio/diacetato de carboxifluoresceína (PI/CFDA). Esta técnica se basa en la distinta coloración (fluorescencia) que presentan los espermatozoides tras su incubación con estos dos colorantes, en función de su viabilidad, entendida ésta como integridad de membrana. Se consideraron viables los espermatozoides teñidos de color verde ya que ello implicaba que su membrana estaba íntegra al presentar impermeabilidad al yoduro de propidio y capacidad de hidrolizar, mediante esterasas, el diacetato de carboxifluoresceína, que es incoloro, a carboxifluoresceína, lo cual da como resultado el color verde. Los espermatozoides con coloración roja se consideraron inviables, ya que la membrana dañada es permeable al yoduro de propidio, el cual penetra en el interior de la célula, se une al ADN, y le proporciona el color rojo.

Las muestras se diluyeron 1:60 en medio bifase y se tiñeron con diacetato de carboxifluoresceína (10 μM en DMSO) y yoduro de propidio (7,3 μM en agua destilada), tras previa adición de formaldehído 1,7 mM para la inmovilización de las células con objeto de lograr una mejor observación. Seguidamente las muestras se incubaron en estufa y en oscuridad a 37 °C durante 15 minutos.

Las muestras se analizaron con un citómetro de flujo FC 500 (Beckman Coulter, Fullerton, CA), que usa un láser de argón a 488 nm. La fluorescencia se detectó utilizando los filtros FL1-525 ± 5 nm (para CFDA) y FL4-675 ± 5 nm (para PI). Se contaron un total de 20.000 eventos, con una media de 500-1.000 eventos/segundo, y se diferenciaron espermatozoides PI-/CFDA+ (con membrana intacta) y espermatozoides PI+ (con membrana dañada).

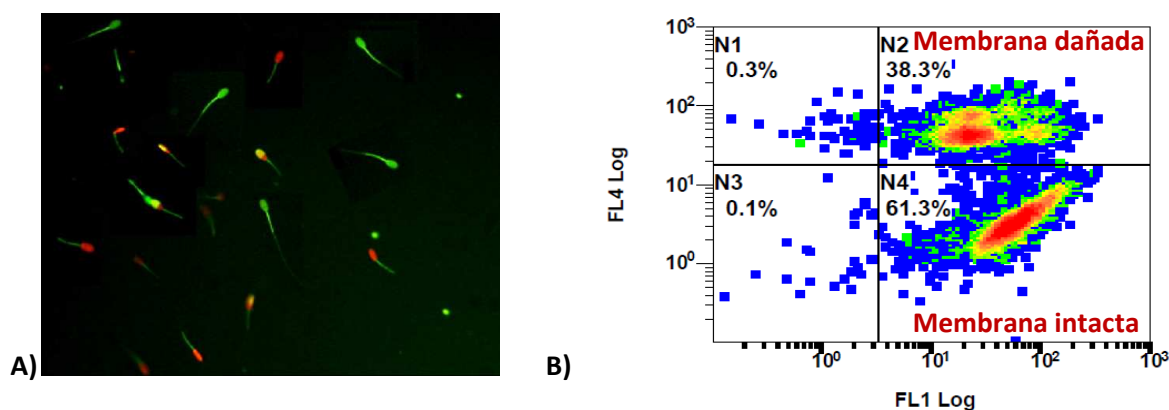


Figura 4. A) Doble tinción de los espermatozoides ovinos con yoduro de propidio y carboxifluoresceína como se observaría con microscopía de fluorescencia en filtro B-2A (filtro de excitación 450-490 nm) y G-2A (filtro de excitación 510-560 nm) y 400x. **B)** Diagrama representativo de la integridad de membrana evaluada por citometría de flujo, utilizando los fotodetectores FL1 y FL4.

4.2.4. Determinación del estado de capacitación

4.2.4.1. Tinción con clorotetraciclina

La clorotetraciclina (CTC) es un antibiótico que al penetrar en la célula espermática, se une al calcio libre y da lugar a patrones característicos de tinción en función de la distribución intracelular de ese catión. Dependiendo de los diferentes estados fisiológicos del espermatozoide, existen diferentes patrones de fluorescencia que permiten hacer una diferenciación entre células no capacitadas, capacitadas y reaccionadas (Gillan *et al.*, 1997). En este estudio se utilizó una versión modificada del ensayo descrito por Ward and Storey (Ward and Storey, 1984) y validada para semen ovino por nuestro grupo de investigación (Grasa *et al.*, 2006).

La solución de clorotetraciclina se preparó el mismo día del experimento a una concentración 750 μM en una solución tampón que contenía Tris 20 mM, NaCl 130 mM y cisteína 5 μM , se pasó por un filtro de 0,22 μm (Millipore Ibérica, Madrid, Spain) y se ajustó el pH a 7,8.

Para realizar la tinción se mezclaron 18 μl de cada muestra (diluídas a una concentración de 8×10^7 células/ml en medio bifase) y 20 μl de la solución de CTC y se fijaron con 5 μl de una solución de paraformaldehído (paraformaldehído al 1,25% (p/v) en tampón Tris-HCl 0,5M, pH 7,4). Se depositó una gota de 6 μl de cada muestra en un portaobjetos y se le añadieron 4 μl de DABCO (antifading, Sigma Chemical Co., Madrid, Spain) para conservar la fluorescencia; se colocó el cubreobjetos y se selló la preparación con esmalte transparente, siempre realizando los procesos protegidos de la luz.

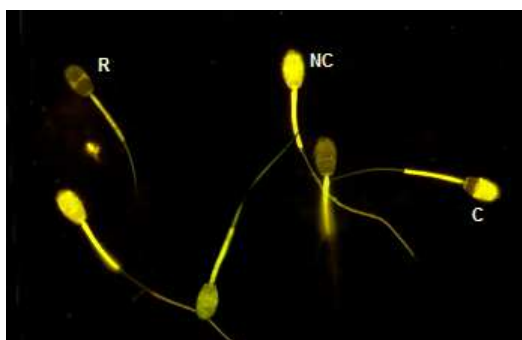


Figura 5. Espermatozoides ovinos teñidos con CTC y visualizados con microscopía de fluorescencia filtro V-2A y 1000x. Se pueden distinguir espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (C), y reaccionados (R).

Se observó con un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E-400) equipado con un filtro V-2A (filtro de 420-490 nm de excitación y 510 nm de emisión) y usando objetivo de inmersión con aumento 100x, se evaluaron unos 200 espermatozoides. Se distinguieron tres tipos distintos según el patrón de tinción (Fig. 5): no capacitados (NC, distribución de la fluorescencia en la cabeza, con o sin una banda ecuatorial brillante), capacitados (C, con fluorescencia en la porción anterior de la cabeza) y células con el acrosoma reaccionado (AR, sin fluorescencia en la cabeza).

4.2.4.2. Detección de la fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas de membrana espermáticas

Extracción de proteínas espermáticas

Se procedió a extraer las proteínas de membrana, por el método descrito por Colás y col. (Colas *et al.*, 2008). A 80 μl de cada muestra conteniendo $1,6 \times 10^8$ células/ml se les añadieron 100 μl del medio de extracción (ESB, *Extraction Sample Buffer*), compuesto por 2 % de SDS (dodecil sulfato sódico, p/v), TRIS-HCl 0,0626 mM (pH 6,8), 0,002 % de azul de bromofenol diluido en glicerol al 10 %

(siendo la concentración final de glicerol del 1 %), e inhibidores de proteasas y fosfatasa (Sigma Chemical Co., Madrid, Spain).

La mezcla se incubó inmediatamente durante 5 minutos a 100 °C en baño de arena. Después se centrifugó a 15000 xg 5 minutos, a temperatura ambiente y se recogió el sobrenadante, desechando el precipitado formado. Finalmente, se añadieron 2-mercaptoetanol y glicerol, a una concentración final del 5 % y el 1 %, respectivamente, y los lisados se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis.

SDS-PAGE e inmunoblotting

Las proteínas se separaron en una dimensión siguiendo el método Laemmli (Laemmli, 1970), utilizando patrones de comparación de pesos moleculares, de 10 a 250 kDa (Sigmamarker, Sigma). Se utilizaron geles de acrilamida del 10 % y las condiciones de electroforesis fueron 130 V durante 90 minutos, a 4 ° C. Una vez separadas las proteínas, fueron transferidas a una membrana de Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA, USA), utilizando una unidad de transferencia en húmedo, modelo Mini-Protean 3 Cell y el módulo Mini Trans-Blot® de BioRad.

Una vez realizada la transferencia de las proteínas, los sitios no específicos de las membranas se bloquearon incubándolas 1 hora con 5 % BSA (w/v), a temperatura ambiente en un tampón fosfato salino (NaCl 3,13 g/l, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 1,44 g/l, KH₂PO₄ 0,24 g/l, y Tween-20 0,5 %, pH 7,4).

La detección de la fosforilación de tirosinas de las proteínas de membrana se realizó a través de la incubación de las membranas durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario monoclonal anti-fosfotirosinas (clone 4G10® Millipore #05-321), diluido 1/1000 en 0,1 PBS Tween-20 con 1 % BSA. Tras realizar tres lavados de 10 minutos de duración con 0,1 % PBS Tween-20, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario (IRDye® 800CW Donkey anti-Mouse) diluido 1/15000, durante 1 hora y 15 minutos temperatura ambiente en semioscuridad. Finalmente, las membranas se escanearon utilizando el Odyssey Clx (Li-Cor Biosciences). Además las membranas se tiñeron con azul Coomassie durante 30 minutos y se destiñeron con 30 % de metanol y con 10 % de ácido acético durante toda la noche, para poder verificar que la transferencia se había producido correctamente.

4.2.5. Determinación de parámetros apoptóticos

4.2.5.1. Determinación de la inversión de fosfatidilserina

La fosfatidilserina (FS) es un fosfolípido que normalmente se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática, pero en procesos apoptóticos se transloca a la cara externa para que la célula sea reconocida por los fagocitos y así ser eliminada. Para evaluar este evento, nos basamos en el uso de la anexina (Annex). La anexina es una proteína con alta afinidad por la FS y que puede obtenerse de forma comercial unida a cualquier colorante fluorescente para su detección, usando un microscopio de fluorescencia o un citómetro de flujo. En este trabajo se usó *Annexin V, Fluorescein Conjugate* (Life technologies), que marca a las células con inversión de FS con fluorescencia verde, junto con yoduro de propidio (PI), que permite diferenciar a la vez las células con membrana íntegra de las que tienen la membrana dañada (fluorescencia roja).

Así podemos distinguir cuatro diferentes poblaciones en nuestra muestra: Anex+/PI+ (células con inversión de FS y membrana dañada), Anex+/PI- (FS invertida pero membrana intacta), Anex-/PI+ (sin inversión de FS, pero la membrana está dañada) y Anex-/PI- (sin inversión de FS y membrana intacta).

Se diluyó la muestra en el tampón proporcionado por la casa comercial (*Binding Buffer Apoptosis Detection Kit, Life technologies*) hasta alcanzar una concentración de 4×10^5 células/ml y

posteriormente se incubaron a 37 °C en oscuridad durante 15 minutos con *Annexin V* y PI. Para analizarlas mediante citometría de flujo, se utilizaron los filtros FL1-525 ± 5 nm (para Anex) y FL4-675 ± 5 nm (para IP).

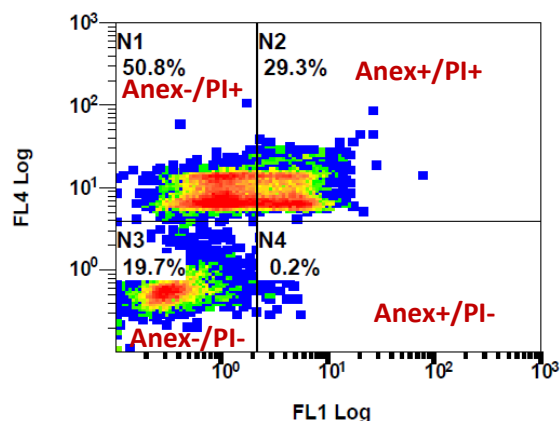


Figura 6. Diagrama representativo de la inversión de fosfatidilserina en la membrana evaluada por citometría de flujo, utilizando los fotodetectores FL1 y FL4.

4.2.5.2. Detección de daño en el ADN

La fragmentación del ADN se considera otro signo de apoptosis celular. En este trabajo esa fragmentación se evaluó mediante la técnica TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-UTP nick end labelling*), usando el kit comercial *In situ cell death detection kit, fluorescein*, de ROCHE. Esta tinción está basada en la utilización de la enzima TdT que añade nucleótidos unidos a fluoresceína a los extremos 3' libres del ADN fragmentado.

Para ello se tomaron alícuotas de las diferentes muestras y se diluyeron con PBS, hasta una concentración final de 4×10^7 células/ml (en un volumen de 100 μ l). Posteriormente se añadió 100 μ l de solución de fijación (PBS al 4% de paraformaldehído) y se incubaron las muestras durante 1 hora en movimiento (rueda de incubación) a temperatura ambiente (20-25 °C). A continuación se lavaron 2 veces con PBS (600 xg, 10 min.) y se incubaron con solución de permeabilización (0,1% de Tritón X-100, 0,1 % de citrato sódico) durante 2 minutos a 4 °C. Se volvieron a realizar dos lavados con PBS (600 xg, 10 min.) y se añadió la mezcla de reacción proporcionada por la casa comercial. Se incubó durante 1 hora a 37 °C en oscuridad (rueda de incubación) y se lavaron 2 veces con PBS (600 xg, 10 min.). Finalmente se evaluaron las muestras por citometría de flujo utilizando el filtro FL1-525 ± 5 nm. Dicha evaluación diferencia dos posibles poblaciones de espermatozoides: TUNEL+ (tienen DNA fragmentado) y TUNEL- (DNA intacto).

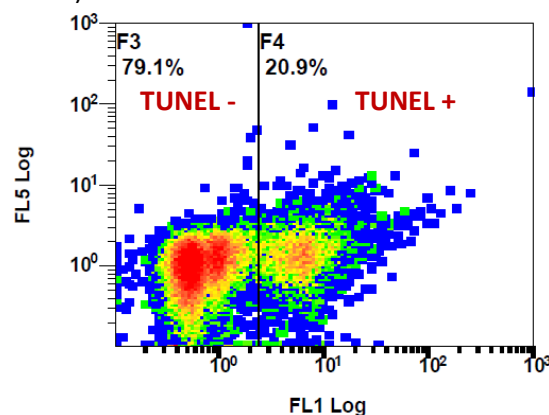


Figura 7. Diagrama representativo de la fragmentación del ADN, evaluado mediante citometría de flujo, empleando el fotodetector FL1.

4.2.5.3. Determinación de la actividad caspasa

Las caspasas (Casp) son proteasas intracelulares implicadas en el proceso de apoptosis. Para la determinación de la actividad de caspasas se utilizó el kit *Vibrant® FAM™ Caspase-3 y -7 Assay* (Invitrogen), que está basado en el la metodología FLICA® (*fluorescent inhibitor of caspases*, o inhibidor fluorescente de las caspasas). El compuesto inhibidor de caspasas que emplea este kit se denomina FAM-DEVD-FMK, tiene fluorescencia verde y se une covalente e irreversiblemente por el péptido D-E-V-D a las cisteínas reactivas de las caspasas 3 y 7 activas, inhibiendo la actividad enzimática de las éstas. El compuesto que reacciona con las caspasas queda retenido en las células y la señal fluorescente verde es una medida directa de la cantidad de caspasas 3 y 7 activas presentes en la célula en el momento que se añadió el reactivo.

Se diluyeron las muestras en PBS hasta una concentración de 3×10^6 células/ml y, siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial, se añadieron 3 μ l de la solución de tinción y se incubaron las muestras durante 1 hora en estufa a 39 °C y 5 % CO₂, protegiéndolas de la luz. Posteriormente se realizaron dos lavados con el tampón de lavado suministrado por el kit, (600 μ g/ 8 minutos/ T^a ambiente), resuspendiendo finalmente el precipitado en el tampón. Las muestras se analizaron por citometría usando el filtro FL1-525 \pm 5 nm, obteniendo dos posibles poblaciones: Casp- ó Casp+.

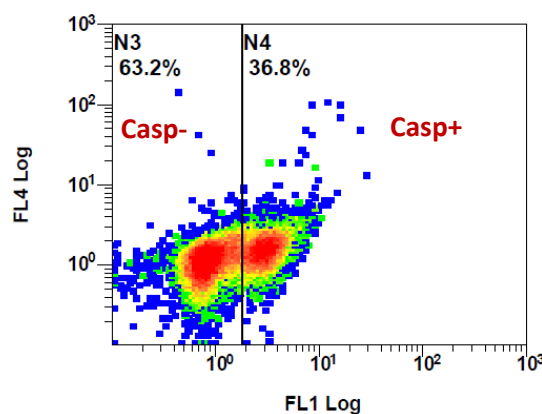


Figura 8. Diagrama representativo de la actividad caspasa, evaluado mediante citometría de flujo, empleando el fotodetector FL1.

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se muestran como la media \pm error estándar del número de experimentos (n) indicado en cada caso. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo a través del software *GraphPad InStat* (3.01; San Diego, CA, USA). Se realizó el análisis estadístico χ^2 comparando todas las muestras para determinar si existían diferencias significativas en la motilidad, en el estado de capacitación, en la integridad de membrana y los marcadores apoptóticos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo se agrupan en dos apartados, el primero incluye los relativos a la comparación de los efectos de los distintos tratamientos térmicos sobre los espermatozoides, y el segundo agrupa a los referentes al efecto de la melatonina sobre espermatozoides refrigerados a 5 °C directamente.

5.1. ANÁLISIS COMPARATIVO DEL EFECTO DE DISTINTOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS DE DESCENSO DE TEMPERATURA SOBRE LA FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA

En esta primera parte se analizaron las alteraciones provocadas en los espermatozoides ovinos por diferentes tratamientos térmicos de descenso de temperatura con el fin de seleccionar el más adecuado para el desarrollo del objetivo principal del trabajo.

Como se puede observar en la Tabla 1, el descenso controlado de la temperatura (-0,2 °C/min) hasta 15 °C, que es la utilizada habitualmente para el mantenimiento de las dosis seminales en los centros de inseminación artificial ovina, no dio lugar a un descenso notable de los parámetros de funcionalidad espermática analizados (15 °C RT vs. *swim-up*), a excepción del estado de capacitación, ya que se produjo un descenso significativo (P<0,01) del porcentaje de espermatozoides no capacitados, lo que conlleva un mayor porcentaje de espermatozoides capacitados. Por tanto, se puede afirmar que el descenso de la temperatura de manera controlada hasta 15 °C desencadena el proceso de criocapacitación en los espermatozoides ovinos.

Tabla 1. Efecto de diferentes tratamientos térmicos de descenso de temperatura sobre la funcionalidad espermática de una muestra seleccionada (*swim-up*). La refrigeración se llevó a cabo desde 25 °C hasta 15 ó 5 °C, directamente o siguiendo una rampa de descenso de temperatura controlada (RT= rampa de temperatura: -0,2 °C/min).

	<i>Swim-up</i>	15 °C RT	5 °C RT	15 °C	5°C
M.T.	78,2 ± 4,8	77,1 ± 4,8	73,8 ± 6	70,5 ± 5,3	70,4 ± 4,5
M.P.	30,4 ± 4,1	24,2 ± 7,8*	36,6 ± 8,6	28,8 ± 6,3	9,1 ± 7,8***
Viabilidad	76,1 ± 4,0	76,0 ± 1,3	70,6 ± 3,4	59,0 ± 8,0**	26,6 ± 2,2***
Casp-	87,2 ± 6,6	97,0 ± 1,0	62,0	64,1 ± 7,5***	64,3 ± 16,0***
Anex-	63,1 ± 4,6	74,0 ± 1,0	38,9 ± 6,2***	38,0 ± 9,3***	39,9 ± 16,2***
No capacitados	61,5 ± 9,3	52,5 ± 15,5**	56,8 ± 7,0**	25,5 ± 5,0***	32,2 ± 2,2***

Valores (%) de espermatozoides: móviles totales (M.T.), móviles progresivos (M.P.), con membrana íntegra (viabilidad), sin caspasas activas (Casp-), sin inversión de fosfatidilserina (Anex-), no capacitados (según tinción con CTC).

Valores medios ± error estándar (n=8 para *swim-up* y n=3-4 para los distintos tratamientos). Se muestran solo las diferencias significativas con respecto al *swim-up*: * P<0,05; ** P<0,01; *** P < 0,001.

Cuando se aplicó la misma rampa de descenso de temperatura, pero prolongando la refrigeración hasta los 5 °C, que es la temperatura a la que normalmente se enfrían las muestras previamente a su congelación, tampoco se afectó de manera importante la motilidad de los espermatozoides, ni su integridad de membrana. En cuanto al estado de capacitación valorado por tinción con CTC, también disminuyeron los espermatozoides no capacitados, observándose diferencias del mismo grado de significación que en el caso anterior (Tabla 1; 5 °C RT vs. *swim-up*). El porcentaje de espermatozoides sin marcadores apoptóticos disminuyó, tanto aquellos sin inversión

de fosfatidilserina (FS) ($63,1 \pm 4,6$ en *swim-up* vs. $38,9 \pm 6,2$ en $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ RT, $P < 0,001$) como aquellos sin caspasas activas ($87,2 \pm 6,5$ en *swim-up* vs. 62 en $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ RT), con respecto a la muestra sin refrigerar.

Sin embargo, cuando el descenso de temperatura fue más brusco, y se refrigeraron las muestras directamente a 15 ó a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin usar un baño de agua programable, la disminución en los parámetros de funcionalidad espermática fue mucho más acusada (Tabla 1). De este modo, la refrigeración rápida hasta $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, aunque no disminuyó de forma ostensible la motilidad espermática, sí afectó en mayor grado a la integridad de membrana ($59,0 \pm 8,0$ vs. $76,1 \pm 4,0$ en la muestra sin refrigerar) y especialmente al estado de capacitación. Así, el porcentaje de espermatozoides no capacitados disminuyó desde un $61,5 \pm 9,3\%$ en la muestra sin refrigerar hasta un $25,5 \pm 5,0\%$ en la muestra refrigerada, siendo este descenso altamente significativo ($P < 0,001$).

En cuanto al resto de los parámetros, disminuyó el porcentaje de células sin caspasas activas, así como las que no presentaban translocación de FS en la membrana, es decir, aumentaron las células con marcadores apoptóticos. Este descenso fue muy similar al provocado por la bajada brusca de temperatura hasta $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($32,2 \pm 2,2$, $64,3 \pm 16$ y $39,9 \pm 16,2$ para espermatozoides no capacitados, sin caspasas activas y sin inversión de FS respectivamente). Sin embargo, este último tratamiento también redujo de forma muy acusada la motilidad progresiva ($9,1 \pm 7,8$ vs. $30,4 \pm 4,1$ en la muestra sin refrigerar) y la integridad de membrana ($26,6 \pm 2,2$ vs. $76,1 \pm 4,0$ en la muestra sin refrigerar).

En general, si se comparan los resultados obtenidos, se puede concluir que los tratamientos de descenso controlado de temperatura, aún cuando ésta alcanza los $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, causan menos daño en las células que los tratamientos de refrigeración directa, incluso cuando éstos se producen a temperaturas más elevada ($15\text{ }^{\circ}\text{C}$).

En resumen, el descenso brusco de la temperatura hasta $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ manifiesta daños asociados al frío a todos los niveles: integridad de membrana, motilidad, grado de capacitación y marcadores apoptóticos. A la vista de estos resultados se decidió escoger este último tratamiento, que afecta de forma importante a todos los parámetros de funcionalidad espermática, para investigar el posible efecto protector de la melatonina en muestras refrigeradas.

5.2. EFECTO DE LA ADICIÓN PREVIA DE DIFERENTES DOSIS DE MELATONINA SOBRE ESPERMATOZOIDEOS SOMETIDOS A REFRIGERACIÓN

En esta parte del trabajo se estudió del efecto de diferentes dosis de melatonina (concentración final de 100 pM , 10 nM ó $1\text{ }\mu\text{M}$) añadidas a los espermatozoides ovinos antes de ser refrigerados de forma brusca hasta $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (sin rampa de temperatura controlada). Se evaluaron los cambios en la motilidad (total y progresiva), la hiperactivación espermática, la integridad de membrana, el estado de capacitación por tinción con CTC y mediante Western Blot de fosfotirosinas, y además de los marcadores apoptóticos analizados en los experimentos previos, se determinó el daño en el ADN mediante la técnica TUNEL.

Como se ha descrito en el apartado anterior, la motilidad, tanto total como progresiva, fue el parámetro que resultó menos afectado tras la refrigeración, no obstante, al realizar el experimento un mayor número de veces se pudieron observar diferencias significativas ($P < 0,001$) al comparar las muestras refrigeradas con la muestra de *swim-up*. Pero la adición previa de melatonina no produjo diferencias significativas con la muestra refrigerada control, a ninguna de las concentraciones ensayadas (Fig. 9).

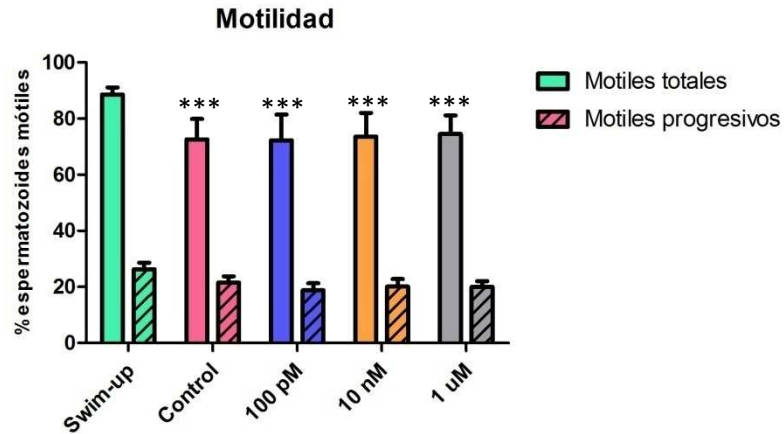


Figura 9. Porcentaje de espermatozoides con motilidad total y progresiva en muestras sin refrigerar (*swim-up*) y refrigeradas sin (control) o con diferentes dosis de melatonina (100 pM, 10 nM ó 1 μ M) añadidas previamente. Valores medios \pm error estándar (n=8). *** P<0,001 comparando con la muestra de *swim-up*.

En la Figura 10 se observa que el porcentaje de espermatozoides hiperactivados antes y después de la refrigeración con o sin melatonina es similar. Curiosamente, en la muestra refrigerada con melatonina 1 μ M se pudo observar un ligero aumento de la hiperactivación flagelar, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados no coinciden con los esperados, ya que, como se ha comentado, la hiperactivación flagelar es uno de los eventos asociados a la capacitación en la mayoría de las especies, y el frío provoca un proceso similar denominado criocapacitación. Sin embargo, aunque ambos procesos (hiperactivación y capacitación por frío) comparten elementos comunes, parece ser que la activación de éstos pueden ocurrir de manera independiente (Suarez, 2008).

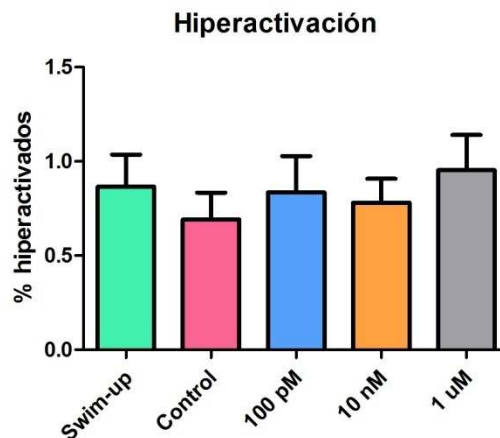


Figura 10. Porcentaje de espermatozoides hiperactivados en las muestras sin refrigerar (*swim-up*) y refrigeradas sin (control) o con diferentes dosis de melatonina (100 pM, 10 nM ó 1 μ M) añadidas previamente. Valores medios \pm error estándar (n=8).

Para poder tener una idea más detallada de este proceso de hiperactivación sería necesario analizar de forma más profunda todas las subpoblaciones de las muestras mediante un análisis de componentes principales (PCA) como el que nuestro grupo está empezado a utilizar en el estudio de la motilidad espermática. También se podría recurrir a otros métodos de análisis como la medición de la curvatura en diferentes puntos a lo largo del flagelo de cada espermatozoide de la muestra (Yanagimachi, 1994; Ohmuro and Ishijima, 2006).

El descenso en la integridad de membrana producido por la refrigeración a 5 °C (Fig. 11), fue más acusado que en la motilidad, como se había observado anteriormente, pero la melatonina, a ninguna de las concentraciones usadas, es capaz de proteger frente a este daño por frío, ya que los valores de integridad de membrana no presentan diferencias significativas con respecto a la muestra refrigerada sin melatonina.

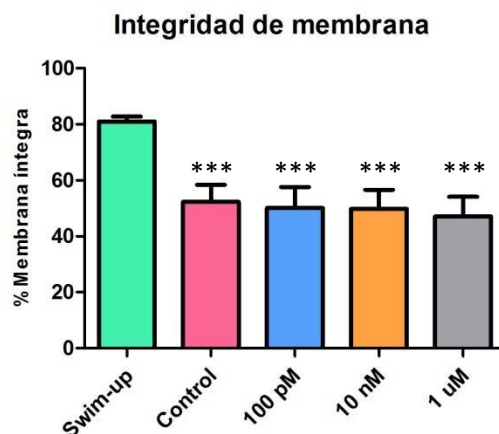


Figura 11. Porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra en muestras sin refrigerar (*swim-up*) y refrigeradas sin (control) o con diferentes dosis de melatonina (100 pM, 10 nM ó 1 μ M) añadidas previamente. Valores medios \pm error estándar (n=8). *** P<0,001 comparando con la muestra de *swim-up*.

Sin embargo, cuando se evaluó el estado de capacitación mediante la tinción con CTC, sí se observaron diferencias significativas (P<0,05) entre las muestras refrigeradas con y sin melatonina (Fig. 12). Concretamente, la adición de melatonina a una concentración final de 100 pM y 10 nM antes de la refrigeración, dio como resultado un mayor porcentaje de espermatozoides no capacitados en comparación con la muestra refrigerada control. Estos resultados sugerirían que esta hormona podría tener cierto efecto protector contra la criocapacitación o capacitación prematura asociada al frío.

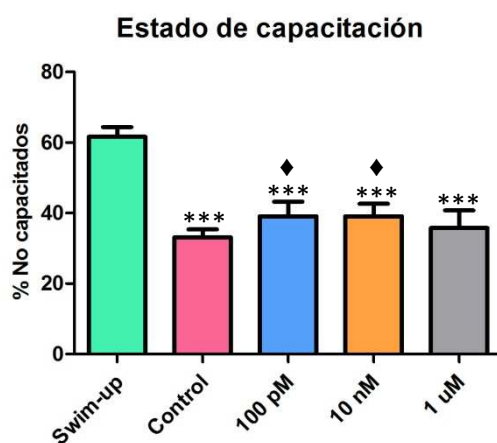


Figura 12. Porcentaje de espermatozoides no capacitados en muestras sin refrigerar (*swim-up*) y refrigeradas sin (control) o con diferentes dosis de melatonina (100 pM, 10 nM ó 1 μ M) añadidas previamente. Valores medios \pm error estándar (n=8). *** P<0,001 comparando con la muestra de *swim-up*, ♦P<0,05 comparando con la muestra control.

Curiosamente, cuando se evaluaron los niveles de fosfotirosinas por Western Blot (Fig. 13), no se apreciaron diferencias entre muestras, ni siquiera entre la muestra antes (*swim-up*) y después de refrigerar, por lo que se puede plantear la hipótesis de que este tipo de tratamiento térmico induce la criocapacitación por otro mecanismo que no implica la fosforilación en residuos de tirosina,

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

o provoca un tipo de desorganización a nivel de membrana y cambios en la distribución intracelular del calcio semejantes a los que se producen durante el proceso de capacitación *in vitro* pero no llega a producir otros cambios asociados. No obstante habría que repetir este experimento un mayor número de veces y llevar a cabo una cuantificación densitométrica para obtener resultados concluyentes.

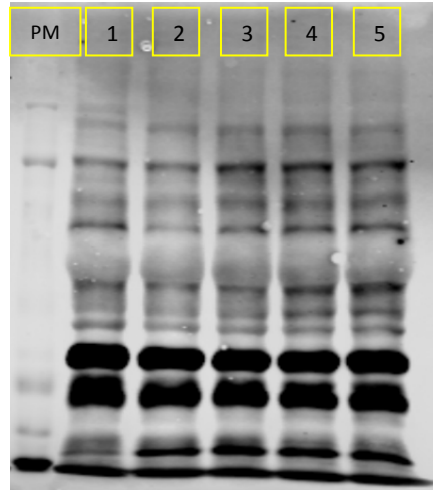


Figura 13. Western Blot con anticuerpos anti-fosfotirosina de proteínas extraídas de espermatozoides, representativo de los obtenidos. PM = marcador de pesos moleculares de 10 a 250 kDa; 1 = muestra sin refrigerar (*swim-up*); 2 = muestra refrigerada sin melatonina (control); 3, 4 y 5 = muestras incubadas con 100 pM (3), 10 nM (4) y 1 μ M (5) de melatonina previamente a la refrigeración.

En cuanto a los marcadores apoptóticos se estudió la inversión de FS, la fragmentación del ADN y la activación de caspasas.

En la Figura 14 se aprecia un mínimo aumento de espermatozoides sin inversión de fosfatidilserina en la población tratada con melatonina 100 pM respecto a la población refrigerada sin melatonina ($56,7 \pm 8,9$ vs $52,9 \pm 6,7$ en el control), aunque esta mejora no es significativa.

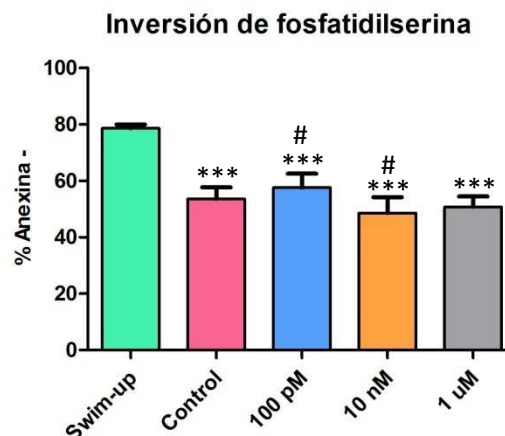


Figura 14. Porcentaje de espermatozoides sin inversión de fosfatidilserina (anexina -) en muestras sin refrigerar (*swim-up*) y refrigeradas sin (control) o con diferentes dosis de melatonina (100 pM, 10 nM ó 1 μ M) añadidas previamente. Valores medios \pm error estándar (n=5). *** P<0,001 comparando con la muestra de *swim-up*, # P<0,05 comparando las muestras con diferentes dosis de melatonina entre sí.

La fragmentación del ADN, como se observa en la Figura 15, no experimenta un aumento claro en espermatozoides sometidos al choque térmico por baja temperatura, sino que el porcentaje de espermatozoides sin fragmentación del ADN permanece constante con los tratamientos. Quizá el

choque térmico sea tan corto en cuanto a duración que apenas da tiempo a desencadenar los mecanismos de daño en el ADN por frío.

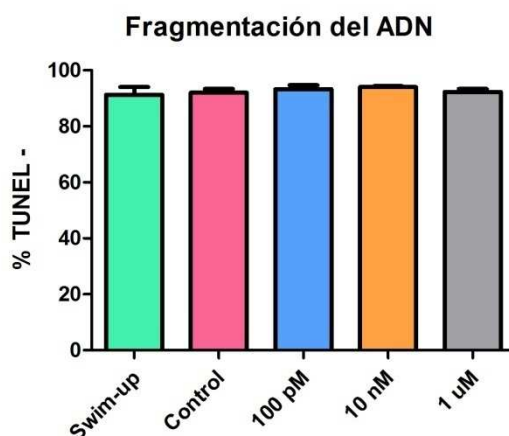


Figura 15. Porcentaje de espermatozoides sin fragmentación del ADN (TUNEL -) en muestras sin refrigerar (*swim-up*) y refrigeradas (control) sin o con diferentes dosis de melatonina (100 pM, 10 nM ó 1 μ M) añadidas previamente. Valores medios \pm error estándar (n=8).

La activación de las caspasas desencadenantes del proceso de apoptosis es un hecho confirmado cuando los espermatozoides son expuestos al frío (Martin *et al.*, 2004), y así se pudo comprobar en este trabajo, ya que se produce un descenso significativo ($P < 0,001$) del porcentaje de espermatozoides sin actividad caspasa tras la refrigeración, lo que significa un aumento de este marcador apoptótico (Fig. 16). Las poblaciones de espermatozoides tratadas con melatonina a concentración final de 100 pM y 10 nM experimentan una menor activación de las caspasas con respecto a la población refrigerada sin melatonina (control) aunque las diferencias no son significativas. Sí se observaron diferencias significativas ($P < 0,01$) al comparar ambas dosis de melatonina con la de 1 μ M.

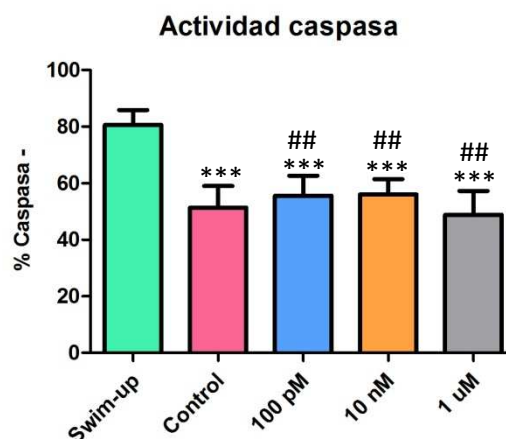


Figura 16. Porcentaje de espermatozoides sin caspasas activas (caspasa -) en muestras sin refrigerar (*swim-up*) y refrigeradas sin (control) o con diferentes dosis de melatonina (100 pM, 10 nM ó 1 μ M) añadidas previamente. Valores medios \pm error estándar (n=8). *** $P < 0,001$ comparando con la muestra de *swim-up*, ## $P < 0,001$ comparando las muestras con diferentes dosis de melatonina entre sí.

Si comparamos de forma global los resultados del estado de capacitación, inversión de fosfatidilserina y activación de caspasas, podemos considerar que, aunque no sea siempre estadísticamente significativo, las concentraciones de melatonina más bajas protegen de los efectos del frío en mayor medida que la más alta.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden extraer de este trabajo son las que se enumeran a continuación:

- 1) El descenso controlado de temperatura hasta 15 °C no produce alteración notable de la funcionalidad espermática, según los parámetros analizados.
- 2) El descenso brusco de temperatura hasta 15 °C causa mayor disminución en los parámetros de funcionalidad espermática que el descenso controlado hasta 5 °C.
- 3) El descenso brusco de temperatura a 5 °C provoca una disminución de la integridad de membrana y de la motilidad progresiva y un aumento en el porcentaje de espermatozoides capacitados y con marcadores apoptóticos, excepto aquellos con daño en el ADN.
- 4) La melatonina, añadida a una concentración de 100 pM o de 10 nM antes de la refrigeración, disminuye de manera significativa alguno de los eventos relacionados con la capacitación provocada por el frío, como la distribución intracelular del calcio evaluada por tinción con clorotetraciclina.
- 5) La melatonina, a dosis bajas (100 pM), disminuye el porcentaje de espermatozoides con marcadores apoptóticos como la inversión de fosfatidilserina y la actividad de caspasas, si bien este descenso no es significativo.

CONCLUSIONS

The conclusions that can be drawn from this work are listed below:

- 1) Controlled decrease of temperature up to 15 °C does not produce noticeable alteration in sperm functionality, according to the parameters analyzed.
- 2) An abrupt drop in temperature to 15 °C causes further decrease on sperm functionality parameters than controlled decrease to 5 °C.
- 3) A sharp drop in temperature to 5 °C causes a decrease on membrane integrity and motility, and an increase on the percentage of capacitated spermatozoa and apoptotic markers, except those with DNA damage.
- 4) Melatonin, in a concentration of 100 pM or 10 nM added before refrigeration, significantly reduces some of the events related to cryocapacitation such as intracellular calcium distribution evaluated by CTC.
- 5) Melatonin, at low doses (100 pM), decreases the percentage of sperm with apoptotic markers as phosphatidylserine translocation and caspase activity, although this decrease is not significant statistically.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez, J. G., J. L. Lasso, L. Blasco, R. C. Nunez, S. Heyner, P. P. Caballero and B. T. Storey (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." *Hum Reprod* **8**(7): 1087-1092.
- Alvarez, J. G. and B. T. Storey (1992). "Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation." *J Androl* **13**(3): 232-241.
- Anzar, M., L. He, M. M. Buhr, T. G. Kroetsch and K. P. Pauls (2002). "Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility." *Biol Reprod* **66**(2): 354-360.
- Baldi, E., R. Casano, C. Falsetti, C. Krausz, M. Maggi and G. Forti (1991). "Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa." *J Androl* **12**(5): 323-330.
- Ball, B. A., A. T. Vo and J. Baumber (2001). "Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa." *Am J Vet Res* **62**(4): 508-515.
- Barrios, B., R. Pérez-Pé, M. Gallego, A. Tato, J. Osada, T. Muiño-Blanco and J. A. Cebrián-Pérez (2000). "Seminal Plasma Proteins Revert the Cold-Shock Damage on Ram Sperm Membrane." *Biology of Reproduction* **63**(5): 1531-1537.
- Barroso, G., M. Morshedi and S. Oehninger (2000). "Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa." *Hum Reprod* **15**(6): 1338-1344.
- Baumber, J., B. A. Ball, C. G. Gravance, V. Medina and M. C. Davies-Morel (2000). "The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation." *J Androl* **21**(6): 895-902.
- Bittman, E. L., R. J. Dempsey and F. J. Karsch (1983). "Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe." *Endocrinology* **113**(6): 2276-2283.
- Casao, A., M. Gallego, J. A. Abecia, F. Forcada, R. Perez-Pe, T. Muino-Blanco and J. A. Cebrian-Perez (2012). "Identification and immunolocalisation of melatonin MT(1) and MT(2) receptors in Rasa Aragonesa ram spermatozoa." *Reprod Fertil Dev* **24**(7): 953-961.
- Casao, A., N. Mendoza, R. Perez-Pe, P. Grasa, J. A. Abecia, F. Forcada, J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2010). "Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate." *Journal of Pineal Research* **48**(1): 39-46.
- Casao, A., R. Perez-Pe, J. A. Abecia, F. Forcada, T. Muino-Blanco and J. A. Cebrian-Perez (2013). "The effect of exogenous melatonin during the non-reproductive season on the seminal plasma hormonal profile and the antioxidant defence system of Rasa Aragonesa rams." *Animal Reproduction Science* **138**(3-4): 168-174.
- Colas, C., J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2010). "Caffeine induces ram sperm hyperactivation independent of cAMP-dependent protein kinase." *Int J Androl* **33**(1): e187-197.
- Colas, C., P. James, L. Howes, R. Jones, J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2008). "Cyclic-AMP initiates protein tyrosine phosphorylation independent of cholesterol efflux during ram sperm capacitation." *Reprod Fertil Dev* **20**(6): 649-658.
- Colas, C., C. Junquera, R. Perez-Pe, J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2009). "Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold-shock." *Microsc Res Tech* **72**(8): 566-572.
- Dacheux, J. L., C. Pisselet, M. R. Blanc, M. T. Hochereau-de-Reviere and M. Courot (1981). "Seasonal variations in rete testis fluid secretion and sperm production in different breeds of ram." *J Reprod Fertil* **61**(2): 363-371.

- Davis, B. K., R. Byrne and B. Hungund (1979). "Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro." Biochim Biophys Acta **558**(3): 257-266.
- Del Valle, I., N. Mendoza, A. Casao, J. A. Cebrian-Perez, R. Perez-Pe and T. Muino-Blanco (2010). "Significance of non-conventional parameters in the evaluation of cooling-induced damage to ram spermatozoa diluted in three different media." Reproduction in Domestic Animals **45**(6): 1439-0531.
- Duru, N. K., M. S. Morshedi, A. Schuffner and S. Oehninger (2001). "Cryopreservation-Thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation." J Androl **22**(4): 646-651.
- Ebling and Hastings (1992). "The neural basis of seasonal reproduction." Annales De Zootechnie **41**: 239-246.
- Eisenbach, M. (2003). "Why are sperm cells phagocytosed by leukocytes in the female genital tract?" Med Hypotheses **60**(4): 590-592.
- García-López, N., M. Ollero, T. Muíño-Blanco and J. A. Cebrián-Pérez (1996). "A dextran swim-up procedure for separation of highly motile and viable ram spermatozoa from seminal plasma." Theriogenology **46**(1): 141-151.
- Gillan, L., G. Evans and W. M. Maxwell (1997). "Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa." Reprod Fertil Dev **9**(5): 481-487.
- González-Arto, M., A. Casao, T. S. R. Hamilton, E. Serrano, D. Arruga, D. Aguilar, A. E. Gaspar, R. Pérez-Pé, T. Muíño-Blanco and J. A. Cebrián-Pérez (2014). Presencia de Enzimas desíntesis de melatonina en el tracto reproductor del morueco: Resultados preliminares. XXXIV Congreso Nacional SEOE.
- Gonzalez-Arto, M., C. Luna, R. Perez-Pe, T. Muino-Blanco, J. A. Cebrian-Perez and A. Casao (2014). "New evidence of melatonin receptor contribution to ram sperm functionality." Reprod Fertil Dev **17**(10).
- Grasa, P., J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2006). "Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation." Reproduction **132**(5): 721-732.
- Harrison, R. A. and S. E. Vickers (1990). "Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa." J Reprod Fertil **88**(1): 343-352.
- Irvine, D. S., J. P. Twigg, E. L. Gordon, N. Fulton, P. A. Milne and R. J. Aitken (2000). "DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality." J Androl **21**(1): 33-44.
- Katz, D. F. and R. Yanagimachi (1981). "Movement characteristics of hamster and guinea pig spermatozoa upon attachment to the zona pellucida." Biol Reprod **25**(4): 785-791.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Langlais, J., M. Zollinger, L. Plante, A. Chapdelaine, G. Bleau and K. D. Roberts (1981). "Localization of cholesteryl sulfate in human spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of capacitation." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7266-7270.
- Luna, C., C. Colas, R. Perez-Pe, J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2012). "A novel epidermal growth factor-dependent extracellular signal-regulated MAP kinase cascade involved in sperm functionality in sheep." Biol Reprod **87**(4).
- Marti, E., R. Perez-Pe, C. Colas, T. Muino-Blanco and J. A. Cebrian-Perez (2008). "Study of apoptosis-related markers in ram spermatozoa." Animal Reproduction Science **106**(1-2): 113-132.
- Martin, G., O. Sabido, P. Durand and R. Levy (2004). "Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm." Biol Reprod **71**(1): 28-37.
- Mortimer, D. (1994). "Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity." Reprod Fertil Dev **6**(1): 25-31.
- Muller, K., T. Pomorski, P. Muller and A. Herrmann (1999). "Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment." J Cell Sci **112** (Pt 1): 11-20.

- Oehninger, S., M. Morshedi, S. L. Weng, S. Taylor, H. Duran and S. Beebe (2003). "Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa." Reprod Biomed Online **7**(4): 469-476.
- Ohmuro, J. and S. Ishijima (2006). "Hyperactivation is the mode conversion from constant-curvature beating to constant-frequency beating under a constant rate of microtubule sliding." Mol Reprod Dev **73**(11): 1412-1421.
- Ollero, M., T. Muino-Blanco, M. J. Lopez-Perez and J. A. Cebrian-Perez (1996). "Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations." Int J Androl **19**(5): 287-292.
- Paasch, U., S. Grunewald, S. Dathe and H. J. Glander (2004). "Mitochondria of human spermatozoa are preferentially susceptible to apoptosis." Ann N Y Acad Sci **1030**: 403-409.
- Perez-Pe, R., P. Grasa, M. Fernandez-Juan, M. L. Peleato, J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2002). "Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa." Mol Reprod Dev **61**(2): 226-233.
- Robertson, L. and P. F. Watson (1986). "Calcium transport in diluted or cooled ram semen." J Reprod Fertil **77**(1): 177-185.
- Roldan, E. R. and R. A. Harrison (1989). "Polyphosphoinositide breakdown and subsequent exocytosis in the Ca²⁺/ionophore-induced acrosome reaction of mammalian spermatozoa." Biochem J **259**(2): 397-406.
- Sakkas, D., E. Seli, G. C. Manicardi, M. Nijs, W. Ombelet and D. Bizzaro (2004). "The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: did apoptosis fail?" Hum Fertil **7**(2): 99-103.
- Saling, P. M., J. Sowinski and B. T. Storey (1979). "An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zonae pellucidae in vitro: sequential relationship to the acrosome reaction." J Exp Zool **209**(2): 229-238.
- Suarez, S. S. (2008). "Control of hyperactivation in sperm." Hum Reprod Update **14**(6): 647-657.
- Visconti, P. E., J. L. Bailey, G. D. Moore, D. Pan, P. Olds-Clarke and G. S. Kopf (1995). "Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation." Development **121**(4): 1129-1137.
- Ward, C. R. and B. T. Storey (1984). "Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay." Dev Biol **104**(2): 287-296.
- Watson, P. F. (1981). "The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein." J Reprod Fertil **62**(2): 483-492.
- Watson, P. F. (1995). "Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function." Reprod Fertil Dev **7**(4): 871-891.
- Weng, S. L., S. L. Taylor, M. Morshedi, A. Schuffner, E. H. Duran, S. Beebe and S. Oehninger (2002). "Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm." Mol Hum Reprod **8**(11): 984-991.
- Yanagimachi, R. (1994). "Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity." Zygote **2**(4): 371-372.
- Zeng, Y., E. N. Clark and H. M. Florman (1995). "Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion." Dev Biol **171**(2): 554-563.
- Zeng, Y., J. A. Oberdorf and H. M. Florman (1996). "pH regulation in mouse sperm: identification of Na(+)-, Cl(-)-, and HCO₃(-)-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation." Dev Biol **173**(2): 510-520.