



## TRABAJO FIN DE GRADO

Estudio del efecto de las hormonas esteroideas frente al daño por frío en los espermatozoides ovinos

---

Study of the effect of steroid hormones against *cold-shock* in ram spermatozoa

**Autor:**

Carlos Murillo Almuzara

**Directores:**

Rosaura Pérez Pé

Silvia Gimeno Martos

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Grado en Biotecnología

Septiembre 2017



La Dra. Rosaura Pérez Pé y Dña. Silvia Gimeno Martos, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza

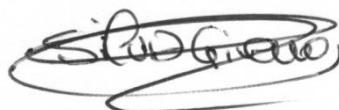
**INFORMAN:**

Que el alumno D. Carlos Murillo Almuzara, ha realizado bajo nuestra dirección, en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, su Trabajo Fin de Grado titulado TRABAJO FIN DE GRADO. Este trabajo cumple los objetivos recogidos en las Directrices TFG en Biotecnología, por lo que se considera procedente su presentación.

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos la presente en Zaragoza a 13 de septiembre de 2017.



Rosaura Pérez Pé



Silvia Gimeno Martos

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
ABSTRACT .....	2
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
2.1. INSEMINACIÓN EN ESPECIE OVINA: REFRIGERACIÓN DE LAS MUESTRAS SEMINALES .....	3
2.2. APOPTOSIS EN ESPERMATOZOIDES .....	5
2.3. PAPEL FISIOLÓGICO DE LA PROGESTERONA Y ESTRADIOL EN LA REPRODUCCIÓN.....	6
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>7</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>8</b>
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 /dextrano</i> .....	8
4.1.3. Refrigeración de las muestras .....	9
4.1.4. Valoración del efecto de la hormona .....	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
4.2.3. 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.....	13
4.2.5. Determinación de parámetros apoptóticos .....	14
4.2.5.1. Determinación de la inversión de fosfatidilserina .....	14
4.2.5.2. Detección de daño en el DNA.....	14
4.2.5.3. Determinación de la actividad caspasa .....	15
4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	16
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>16</b>
5.1. EFECTO DE LA ADICIÓN PREVIA DE DIFERENTES DOSIS DE PROGESTERONA SOBRE ESPERMATOZOIDES SOMETIDOS A REFRIERACIÓN .....	16
5.2. EFECTO DE LA ADICIÓN PREVIA D7 DIFERENTES DOSIS DE ESTRADIOL SOBRE ESPERMATOZOIDES SOMETIDOS A REFRIGERACIÓN .....	21
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>26</b>
CONCLUSIONS .....	26
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>27</b>

## 1. RESUMEN

Actualmente, la mayoría de muestras seminales ovinas son refrigeradas como método de preservación para su uso a corto plazo en inseminación artificial (IA). Sin embargo, los espermatozoides de la especie ovina presentan una mayor susceptibilidad al frío en comparación con otras especies provocando una serie de efectos negativos incluyendo pérdida de motilidad, alteraciones estructurales, aumento de marcadores apoptóticos, daño oxidativo y capacitación prematura asociada al frío conocida como criocapacitación.

La progesterona ( $P_4$ ) y el estradiol ( $E_2$ ) son hormonas esteroideas fundamentales en la reproducción de los mamíferos, que regulan la expresión génica en el eje hipotalámico-hipofisario gonadal mediada por receptores nucleares. También se han encontrado receptores específicos para éstas en la membrana de los espermatozoides permitiendo una acción directa de las hormonas sobre ellos. Se ha demostrado la implicación de estas hormonas en el proceso de capacitación espermática que consiste en una serie de cambios que sufre el espermatozoide en el tracto reproductor femenino y que le confieren capacidad fecundante. Además, estudios recientes sugieren que estas hormonas también podrían aumentar la supervivencia espermática y la protección frente a los procesos apoptóticos. En cuanto al daño por frío, existe algún trabajo que demuestra la implicación de la  $P_4$  en la mejora de la respuesta celular al daño por frío, aunque no existe ninguno sobre el posible papel crioprotector de estas hormonas esteroideas en espermatozoides.

En consecuencia, el objetivo principal de este trabajo fue estudiar el efecto que tiene la adición previa de diferentes dosis de  $P_4$  y  $E_2$  sobre la motilidad, integridad de membrana, estado de capacitación y marcadores apoptóticos de los espermatozoides ovinos sometidos a una bajada brusca de temperatura a 5 °C (*cold-shock*). Para ello, se realizó un proceso de selección espermática mediante la técnica de *swim-up/dextrano* y se incubaron las muestras con  $P_4$  ó  $E_2$  a concentraciones de 100pM, 10 nM y 1  $\mu$ M seguido de la refrigeración de las mismas.

Los resultados mostraron un papel crioprotector de la  $P_4$  y el  $E_2$  evitando la pérdida de motilidad espermática a consecuencia del frío. Así mismo, la  $P_4$ , a dosis bajas (100 pM), disminuyó el porcentaje de espermatozoides capacitados. Sin embargo, la presencia de estas hormonas no fue capaz de evitar el incremento en los niveles de los marcadores apoptóticos en los espermatozoides ovinos sometidos a la acción del frío.

## ABSTRACT

Currently, most ovine seminal samples are refrigerated as a preservation method for short-term artificial insemination (AI) use. However, ram spermatozoa show a greater susceptibility to *cold-shock* compared to other species, causing several negative effects including loss of motility, structural alterations, increase of apoptotic markers, oxidative damage and premature capacitation known as cryoacapacitation.

Progesterone ( $P_4$ ) and estradiol ( $E_2$ ) are steroid hormones which play an important role in the reproduction of mammals, by regulating gene expression of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis mediated by nuclear receptors. Moreover, specific receptors have been found in the sperm membrane allowing direct action of these hormones on them. The implication of these hormones in the capacitation process, consisting in a set of changes undergone by sperm in the female reproductive tract acquiring fertilizing capacity, has been demonstrated. In addition, recent studies suggest that these hormones could also increase sperm survival and protect them against apoptotic processes. Regarding cold damage, some studies have demonstrated the implication of  $P_4$  in improving the cellular response to cold damage, although none of them are about the possible cryoprotective role of these steroid hormones in spermatozoa.

Therefore, the main aim of this project was to study the effect of the addition of different doses of  $P_4$  and  $E_2$  on the motility, membrane integrity, capacitation and apoptotic markers of ram spermatozoa followed by a sudden drop in temperature to 5 °C (*cold-shock*). Sperm samples were selected by a dextran/*swim-up procedure* and incubated with  $P_4$  or  $E_2$  at concentrations of 100 pM, 10 nM and 1  $\mu$ M followed by cooling of the sperm samples.

The obtained results showed a cryoprotective role of  $P_4$  and  $E_2$  in sperm motility avoiding loss of sperm motility due to *cold-shock*. Likewise,  $P_4$ , at low doses (100 pM), decreased the percentage of capacitated spermatozoa. In contrast, the presence of these hormones was not able to avoid the increase of the apoptotic markers levels in cooled ram spermatozoa.

## 2. INTRODUCCIÓN

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

La inseminación artificial (IA) puede considerarse como la tecnología más antigua y ampliamente utilizada de reproducción asistida (ART). El uso de la IA en la reproducción animal se introdujo originalmente por razones sanitarias (para prevenir la propagación de enfermedades de transmisión sexual). Los ganaderos pronto reconocieron que era el método ideal para la introducción rápida de genes valiosos en una población con el fin de mejorar sus rasgos de producción.

La IA en la especie ovina está mucho menos difundida que en otras especies domésticas. Esto se debe no sólo a que los resultados de fertilidad sean irregulares y bajos, sino también a la dificultad de mejorar los métodos de preservación del esperma. Además, la estructura cervical del útero ovino es compleja, dificultando la deposición del semen de forma profunda en el tracto genital femenino. A todo esto se le une que los espermatozoides ovinos presentan una mayor susceptibilidad al frío en comparación con otras especies (Holt and North, 1984).

Actualmente, la mayoría de dosis usadas en IA en ovino son refrigeradas a 15 °C, permitiendo el mantenimiento del semen durante 6-8 horas. El objeto de refrigerar las muestras es el de prolongar la capacidad fecundante al reducir la motilidad y el metabolismo de los espermatozoides de forma reversible (Watson, 1995). Pero, para el mantenimiento de las muestras a largo plazo, incluso años, es necesario congelarlas, y la congelación provoca una serie de daños en los espermatozoides. El proceso de congelación implica generalmente dos etapas, una refrigeración hasta 5 °C y una congelación posterior hasta -140 °C. El enfriamiento hasta 5 °C induce un daño a los espermatozoides conocido como *cold-shock*.

Los efectos negativos producidos son proporcionales a la velocidad de enfriamiento, el intervalo de temperatura y el rango de temperatura (Watson, 1981). La susceptibilidad de los espermatozoides al *cold-shock* varía entre especies y depende de la proporción de ácidos grasos insaturados en los fosfolípidos de la membrana plasmática así como del contenido en colesterol (White, 1993). En espermatozoides ovinos (especialmente susceptibles al *cold-shock*) el contenido de colesterol es aproximadamente  $300 \mu\text{g}/10^9$  espermatozoides; mientras que los de especies como el conejo o humano (poco susceptibles al *cold-shock*) es de  $550 \mu\text{g}/10^9$  espermatozoides (Darin-Bennett and White, 1977). Los efectos negativos desencadenados por el *cold-shock* pueden ser:

1. **Pérdida de motilidad:** se trata de uno de los efectos más notables como consecuencia de la bajada brusca de temperatura. El espermatozoide sufre cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática a nivel del flagelo, disminuye la captación de oxígeno y caen los niveles de ATP dejando de aportar energía y, por tanto, se reduce la motilidad (Wales and White, 1959).
2. **Alteraciones estructurales:** Se produce una pérdida de fosfolípidos de membrana, concretamente fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (Alvarez and Storey, 1992), tornándola inestable y aumentando la permeabilidad. Esto implica una pérdida de

algunos cationes (Blackshaw and Salisbury, 1957), ATP (Mann and Lutwak, 1955), ácidos nucleicos y enzimas (Harrison and Flechon, 1980). La microscopía electrónica también ha demostrado que el *cold-shock* produce cambios profundos en la membrana acrosomal de la especie ovina (Quinn *et al.*, 1969). Los cambios en la membrana fosfolipídica también afectan a las proteínas que se albergan en ella, que pueden perder su función (Robertson and Watson, 1986).

3. **Daño oxidativo:** Estudios con espermatozoides de varias especies, demostraron que la criopreservación está asociada con un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ball *et al.*, 2001). Dicho estrés oxidativo favorece la peroxidación lipídica en espermatozoides humanos (Alvarez and Storey, 1992) y de jabalí (Brouwers *et al.*, 2005). En el caso de los espermatozoides ovinos, el alto contenido de ácidos grasos insaturados que presenta, aumenta la susceptibilidad espermática a la peroxidación en presencia de oxígeno. Los efectos de la peroxidación incluyen pérdida irreversible de motilidad, fuga de enzimas intracelulares y daño estructural a nivel de la membrana plasmática, particularmente en la región acrosomal. Además, producen daño a nivel de DNA tal y como se ha visto en el estudio de Donnelly *et al.*, (1999) en muestras espermáticas humanas.
4. **Criocapacitación:** La capacitación espermática es un proceso imprescindible para que los espermatozoides adquieran la capacidad fecundante. Ocurre en el tramo final del útero o en el oviducto y conlleva cambios en la membrana plasmática (Gadella *et al.*, 2008), movimientos del calcio intracelular (Lishko *et al.*, 2011) y una serie de cascadas de transducción de señales bioquímicas (Grasa *et al.*, 2006 ; Tulsiani *et al.*, 2007). Se ha visto que tras el *cold-shock* los espermatozoides se comportan como espermatozoides capacitados (criocapacitación). 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). Actualmente, los mecanismos por los que se produce la criocapacitación no están definidos.
5. **Aumento de marcadores apoptóticos:** se produce fragmentación de DNA, translocación de la fosfatidilserina, y presencia de caspasas activas. El descenso de temperatura implica un aumento de estos marcadores tal y como se ha observado en numerosas especies (Anzar *et al.*, 2002 ; De Paula *et al.*, 2006 ; Chaveiro *et al.*, 2007 ; Martin *et al.*, 2007 ; (Brum *et al.*, 2008 ; Ortega-Ferrusola *et al.*, 2009). En la especie ovina, nuestro grupo demostró, que además de la refrigeración a 5 °C, el posterior aumento de temperatura a 37 °C que simularía el paso por el tracto reproductor femenino, provoca un nuevo incremento en estos marcadores apoptóticos (Del Valle *et al.*, 2010).

## 2.2 APOPTOSIS EN ESPERMATOZOIDES

La apoptosis es un proceso de autodestrucción celular activo que sigue una secuencia de pasos controlados (Figura 2.1) y no causa ningún tipo de reacción inflamatoria. Las células apoptóticas se caracterizan por algunos cambios morfológicos, especialmente en la superficie celular (translocación de fosfatidilserina, contracción celular) y en el núcleo (fragmentación, hipercondensación de la cromatina y degradación del DNA). El número de células reproductoras en los túbulos seminíferos de los testículos, viene determinado por el balance entre la proliferación celular y el proceso de apoptosis (Russell *et al.*, 2002). Curiosamente, también se ha detectado la presencia de células apoptóticas en el eyaculado (Gorczyca *et al.*, 1993 ; Anzar *et al.*, 2002 ; Martí *et al.*, 2006) aunque las razones todavía no están claras. 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 también a causas patológicas (Oehninger *et al.*, 2003). La presencia de espermatozoides apoptóticos en el eyaculado puede ser uno de los factores que influyan en la baja fertilidad, tal y como se ha visto en humanos (Taylor *et al.*, 2004 ; Said *et al.*, 2006) y en morocho (E. Martí *et al.*, 2008).

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), como se ha comentado en el apartado anterior.

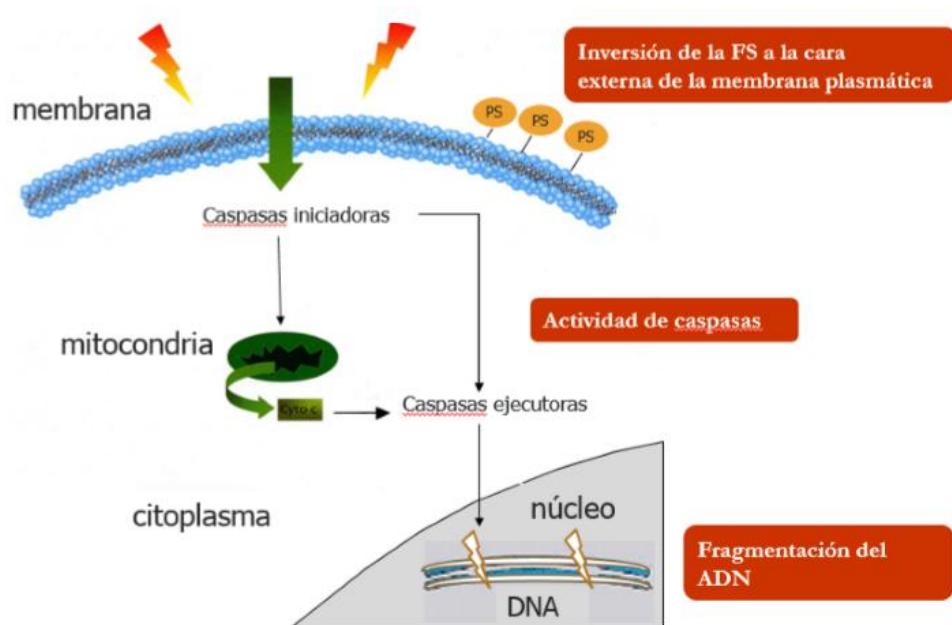


Figura 2.1 Parámetros apoptóticos del espermatozoide

## **2.3 PAPEL FISIOLÓGICO DE LA PROGESTERONA Y ESTRADIOL EN LA REPRODUCCIÓN**

La progesterona ( $P_4$ ) y el 17- $\beta$  estradiol ( $E_2$ ) son hormonas sexuales esteroideas que juegan un papel fundamental en la regulación de los procesos reproductivos de mamíferos (Tausk and De Viser, 1971 ; Sinchak and Wagner, 2012). El mecanismo de acción clásico de estas hormonas es la regulación de la expresión génica en el eje hipotalámico-hipofisario gonadal mediada por receptores nucleares (O'Malley and Tsai, 1992). Sin embargo, estos últimos años se ha postulado la posible regulación no genómica de la funcionalidad espermática por la progesterona y estradiol, a través de receptores de membrana (Baldi *et al.*, 2009). Estos receptores específicos, han sido identificados en varias especies (De Amicis *et al.*, 2011 ; Rago *et al.*, 2014 ; Arkoun *et al.*, 2014), y recientemente, por nuestro grupo en la especie ovina (Gimeno-Martos *et al.*, 2017).

Tanto la  $P_4$  como el  $E_2$  se pueden encontrar en el tracto reproductor femenino, en el fluido folicular y en las cercanías del ovocito a concentraciones micromolares (Wang *et al.*, 2001), sin embargo la concentración exacta de hormona a lo largo del tracto reproductor femenino es muy complicada de estimar debido a la influencia de factores como el momento del ciclo estral y estadío de las células de la granulosa o las diferencias entre las distintas especies, existiendo probablemente un gradiente de concentración desde las proximidades del ovocito hasta las zonas más distales (Sagare-Patil *et al.*, 2012). La unión de estas hormonas a sus receptores específicos en la membrana de los espermatozoides daría lugar a una serie de respuestas en intervalos de tiempo más cortos (respuestas rápidas).

Estudios realizados a lo largo de las dos últimas décadas indican que la incubación con  $P_4$ , *in vitro*, estimula varias funciones espermáticas como la hiperactivación, quimiotaxis, capacitación y reacción acrosómica (Muratori *et al.*, 2009 ; Gimeno-Martos *et al.*, 2017). En el caso del  $E_2$ , su función parece más controvertida, y mientras que para algunos autores parece ser la de modular/inhibir los efectos de la  $P_4$  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 ; Gimeno-Martos *et al.*, 2017).

### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

La progesterona y el estradiol son hormonas esteroideas presentes en el fluido folicular y en las cercanías del ovocito, secretadas por las células del *cúmulus* y por las células de la *granulosa* respectivamente (Wang *et al.*, 2001). Se han descrito receptores específicos para estas hormonas en la membrana de los espermatozoides ovinos (Gimeno-Martos *et al.*, 2017).

Además de los estudios que describen la implicación de estas hormonas en la capacitación, estudios recientes sugieren que estas hormonas también podrían aumentar la supervivencia espermática y la protección frente a los procesos apoptóticos (Aquila *et al.*, 2004 ; De Amicis *et al.*, 2012). Hasta la fecha no hay estudios acerca de un posible papel crioprotector de estas hormonas. Sí se ha visto que, en otros tejidos, la progesterona mejora la respuesta celular al daño por frío; se descubrió que inducía la formación de mielina por células de Schwann criodañadas en ratones y la mielinización de axones en ganglios dorsales de rata bajo condiciones de cultivo. (Koenig *et al.*, 1995).

Tomando como base los antecedentes expuestos, la **hipótesis** que se plantea en este trabajo es que la P<sub>4</sub> y el E<sub>2</sub> pueden 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; ejerciendo así un papel crioprotector.

Por consiguiente, los **objetivos** del presente trabajo fueron los siguientes:

- 1.** Estudiar el efecto que tiene la adición previa de diferentes dosis de progesterona y estradiol sobre la motilidad e integridad de membrana de los espermatozoides ovinos sometidos a una bajada brusca de temperatura a 5 °C (*cold-shock*).
- 2.** Estudiar el efecto que tiene la adición previa de diferentes dosis de progesterona y estradiol sobre el estado de capacitación de los espermatozoides ovinos sometidos a una bajada brusca de temperatura a 5 °C (*cold-shock*).
- 3.** Estudiar el efecto que tiene la adición previa de diferentes dosis de progesterona y estradiol sobre los marcadores apoptóticos en los espermatozoides ovinos sometidos a una bajada brusca de temperatura a 5 °C (*cold-shock*).

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 PROCESADO DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS

#### 4.1.1 Obtención de las muestras seminales

El semen empleado para los experimentos procede de moruecos adultos, propiedad de 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 cuidado de los sementales como la obtención de las muestras corrieron a cargo del personal del SEA. El régimen de extracciones de semen al que se ha sometido a los animales ha sido de tres por semana, lo que implica períodos 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 (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 perjudicial para los espermatozoides ovinos, el método no incluye centrifugación (Figura 4.1). 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 mótiles y viables.

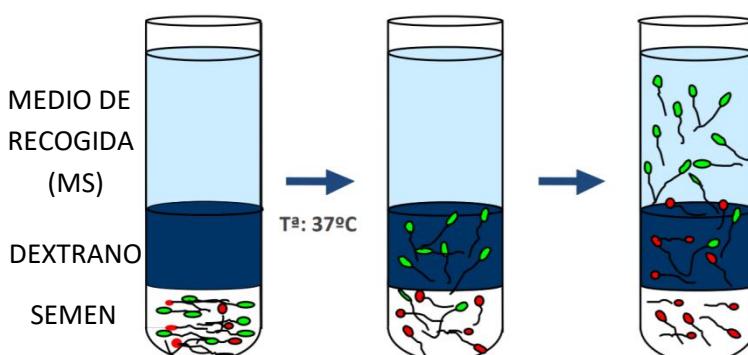


Figura 4.1 Esquema del método de selección de espermatozoides mediante *swim-up/dextrano*.

La composición del medio utilizado para el *swim-up* (MS) fue la siguiente: NaCl 50 mM, KCl 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,4 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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.

Las cantidades empleadas, tanto de muestra seminal, como de medio, para el correcto desarrollo del *swim-up/dextrano* fueron las usadas habitualmente en nuestro laboratorio (García-López et al., 1996). Se colocaron cuidadosamente 500 µl de semen en el fondo de un tubo cónico de 15 mm de diámetro y sobre él se depositaron 500 µl 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 añadieron lentamente 1500 µl 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 750 µl de fase superior que se designó como primer sobrenadante y seguidamente se añadieron otros 750 µl 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**

Se optó por un tratamiento incubando directamente las muestras a 5 °C, con una bajada brusca de temperatura. Para ello se colocaron las muestras obtenidas por *swim-up* en un baño de hielo picado durante 10 minutos. Previamente, nuestro grupo realizó un análisis comparativo de diferentes tratamientos térmicos de descenso de la temperatura (descenso controlado y bajada brusca) y concluyó que la bajada brusca hasta 5 °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 tratamiento para valorar el posible efecto protector de la progesterona y el estradiol en las muestras refrigeradas.

#### **4.1.4 Valoración del efecto de la hormona**

Previo al tratamiento de refrigeración (*cold-shock*), las muestras obtenidas tras el *swim-up* se incubaron con P<sub>4</sub> o con E<sub>2</sub>. Las hormonas se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y PBS y se añadió a las muestras para conseguir unas concentraciones finales de 100 pM, 10 nM y 1 µM, respectivamente. Como se ha comentado, P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub> se pueden encontrar en el tracto reproductor femenino, en el fluido folicular y en las cercanías del ovocito a concentraciones micromolares (Wang et al., 2001), sin embargo existe probablemente un gradiente de concentración desde las proximidades del ovocito hasta las zonas más distales. Es por esto que elegimos dicho abanico de concentraciones abarcando las distintas posibilidades. La concentración final de DMSO en todas las muestras fue del 0,1/1000 (v/v). También se sometió a esta refrigeración a un grupo control incubado con la misma concentración de DMSO (sin

hormona) para sí asegurar que el efecto resultante observado sea consecuencia únicamente de las hormonas añadidas. El diseño experimental planteado se muestra en la Figura 4.2



**Figura 4.2.** 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 puso una gota de 6 µl 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 siguiente fórmula:

$$C = \text{nº espermatozoides contados} \times 10^4 \text{ ml} \times \frac{1}{\text{dilución}} = \text{espermatozoides/ml}$$

### 4.2.2 Análisis de la motilidad espermática

La determinación de la motilidad espermática se llevó a cabo utilizando un sistema automatizado de análisis espermático conectado a un ordenador (CASA, *computerassisted 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, analizándose la motilidad mediante el programa ISAS. Se analizaron 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 mótiles (lentos, medios y rápidos). Además proporciona valores de motilidad total (MT) (% de espermatozoides mótiles) y

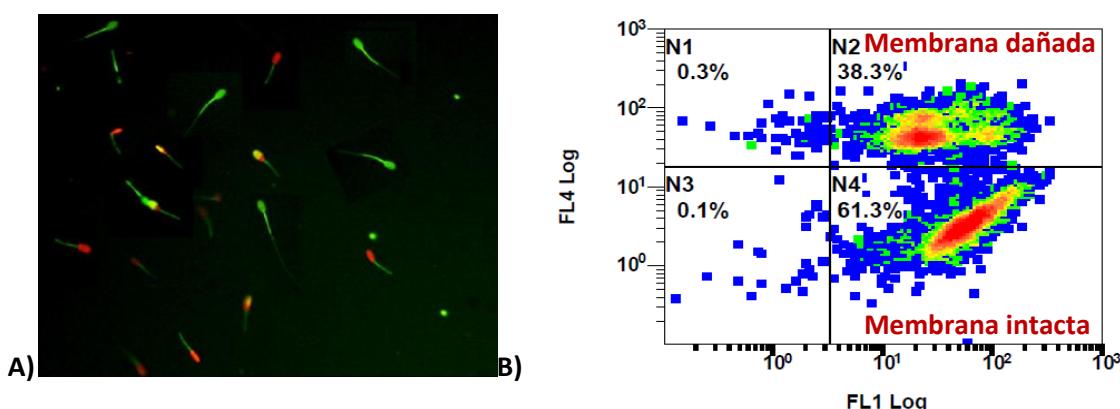
motilidad progresiva (MP) (% de espermatozoides que se mueven siguiendo una trayectoria recta).

#### 4.2.3 Evaluación de la integridad de la membrana plasmática

La integridad de la membrana espermática se evaluó mediante el método del ioduro de propidio/diacetato de carboxifluoresceína (PI/CFDA) descrito por Harrison y Vickers (Harrison and Vickers, 1990). Esta técnica se basa en la distinta fluorescencia que se observa en los espermatozoides tras su incubación con estos dos colorantes, en función de su viabilidad (entendida 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 ioduro de propidio (rojo) 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 ioduro de propidio, el cual penetra en el interior de la célula, se une al DNA, 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 ioduro 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. A continuación 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 observó 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 4.3 A)** Doble tinción de los espermatozoides ovinos con yoduro de propidio y carboxifluoresceína como se observaría con microscopía de fluorescencia en filtro B-2<sup>a</sup> (filtro de excitación 450-490 nm) y G-2<sup>a</sup> (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.

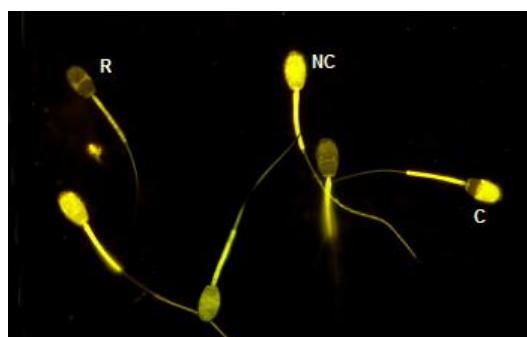
#### 4.2.4 Determinación del estado de capacitación

##### 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 distintos 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 empleó 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 efectuar la tinción se mezclaron 18µl de cada muestra (diluidas a una concentración de  $8 \times 10^7$  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 colocó una gota de 6µl de cada muestra en un portaobjetos y se le añadieron 3µl de DABCO (antifadding, Sigma Chemical Co., Madrid, Spain) para preservar la fluorescencia; se colocó el cubreobjetos y se selló la preparación con esmalte transparente, siempre efectuando los procesos protegidos de la luz.



**Figura 4.4** Espermatozoides ovino teñidos con CTC y visualizados con microscopía de fluorescencia filtro V-2<sup>a</sup> y 1000x. Se pueden distinguir espermatozoides no capacitados (NC), capacitados <sup>®</sup>, y reaccionados <sup>®</sup>.

Se observó con un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E-400) equipado con un filtro V-2<sup>a</sup> (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 apreciaron tres tipos distintos según el patrón de tinción (Fig. 4.4): 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 (R, 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 extrajeron 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 fosfatases (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, desecharando el precipitado formado. Para finalizar, se añadieron 2-mercaptopetanol 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 usaron 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.

Tras realizar 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, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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-fosftirosinas (clone 4G10® Millipore #05-321), diluido 1/1000 en 0,1 PBS Tween-20 con 1% BSA. Tras efectuar 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 sistema OdysseyClx (Li-CorBiosciences). 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 de forma correcta. Se cuantificó la señal para determinar la intensidad relativa de las bandas de fosftirosinas de las proteínas con el programa Quantity One software (Bio Rad, Hercules, CA, USA).

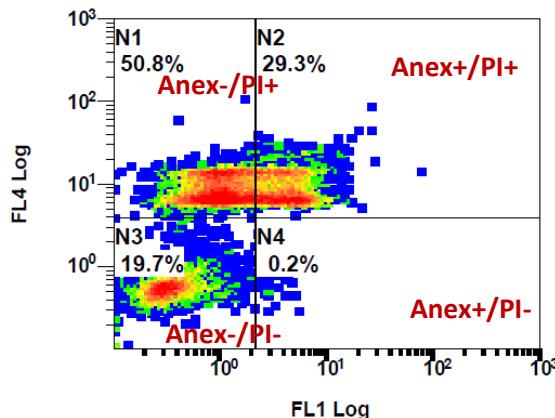
#### 4.2.5 Determinación de parámetros apoptóticos

##### 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 ser así 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 (Lifetechnologies)*, que marca a las células con inversión de FS con fluorescencia verde, junto con ioduro de propidio (PI), que posibilita 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 facilitado por la casa comercial (*Binding Buffer Apoptosis Detection Kit, Lifetechnologies*) hasta alcanzar una concentración de  $4 \times 10^6$  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 PI).



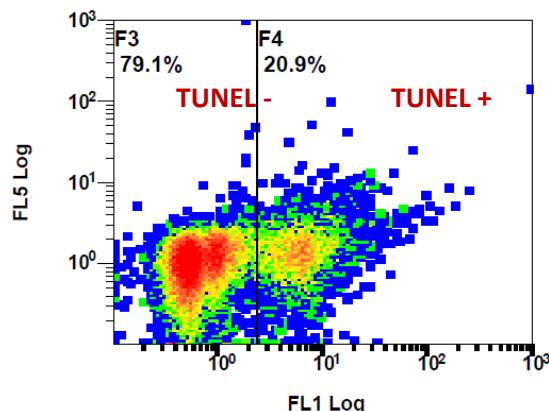
**Figura 4.5** Diagrama representativo de la inversión de fosfatidilserina en la membrana evaluada por citometría de flujo, utilizando los fotodetectores FL1 y FL4.

##### 4.2.5.2 Detección de daño en el DNA

La fragmentación del DNA se considera otro signo de apoptosis celular. En este trabajo esa fragmentación se evaluó mediante la técnica TUNEL (*terminal deoxynucleotidyltransferase-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 DNA fragmentado.

Para ello se tomaron alícuotas de las diferentes muestras y se diluyeron con PBS, hasta una concentración final de  $4 \times 10^7$  células/ml (en un volumen de 100 µl). Posteriormente se añadió 100 µl 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 agregó 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).

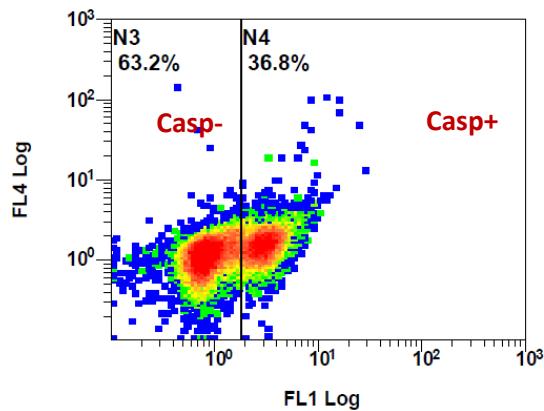


**Figura 4.6** Diagrama representativo de la fragmentación del DNA, evaluado mediante citometría de flujo, empleando el fotodetector FL1.

#### 4.2.5.2 Determinación de la actividad caspasa

Las caspasas son proteasas intracelulares implicadas en el proceso de apoptosis. Para la determinación de la actividad de caspasas se utilizó el *kitVibrant® FAM™ Caspase-3 y -7 Assay* (Invitrogen), que está fundamentado en la metodología FLICA® (*fluorescent inhibitor of caspases*, o inhibidor fluorescente de las caspasas). El compuesto inhibidor de caspasas que utiliza 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  $3 \times 10^6$  células/ml y, siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial, se añadieron 3  $\mu\text{l}$  de la solución de tinción y se incubaron las muestras durante 1 hora en estufa a 39 °C y 5% CO<sub>2</sub>, protegiéndolas de la luz. Posteriormente se realizaron dos lavados con el tampón de lavado suministrado por el kit, (600 xg/8 minutos/T<sup>a</sup> ambiente), resuspendiendo finalmente el precipitado en el tampón. Las muestras se analizaron por citometría usando el filtro FL1-525 ± 5 nm, obteniendo dos posibles poblaciones: Casp- ó Casp+.



**Figura 4.7.** 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 ± error estándar del número de experimentos (*n*) indicado en cada caso. Los análisis estadísticos se realizaron a través del software *GraphPadInStat* (3.01; San Diego, CA, USA). Se realizó el análisis estadístico  $\chi^2$  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. Además, se empleó un análisis de varianza (one-way ANOVA) para la cuantificación del Western de fosfotirosinas.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

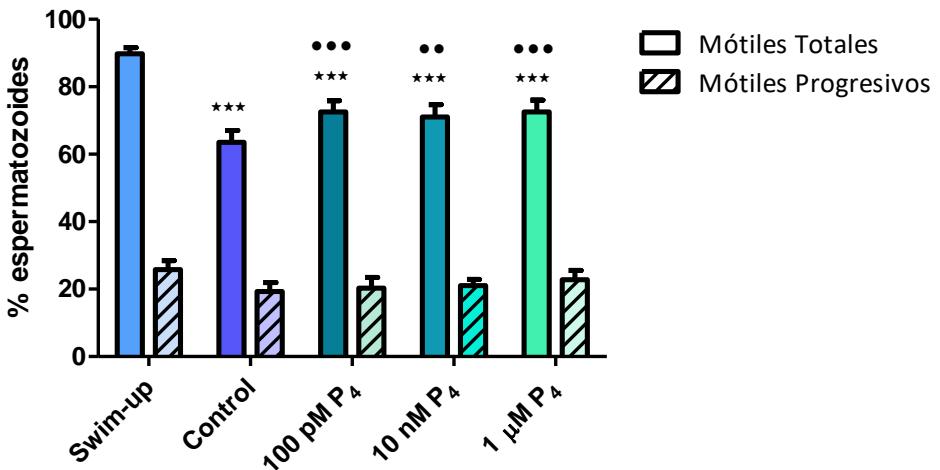
### 5.1 EFECTO DE LA ADICIÓN PREVIA DE DIFERENTES DOSIS DE PROGESTERONA SOBRE ESPERMATOZOIDES SOMETIDOS A REFRIGERACIÓN

Se analizó el efecto de diferentes dosis de progesterona (100 pM, 10 nM ó 1  $\mu$ M) añadidas a los espermatozoides ovinos antes de ser refrigerados de forma brusca (*cold-shock*) a 5 °C durante 10 minutos. Se evaluaron cambios en la motilidad, la integridad de membrana, el estado de capacitación (tinción con CTC y Western Blot de fosfotirosinas) y los parámetros apoptóticos (actividad de caspasas, inversión de fosfatidilserina y fragmentación del DNA).

#### 5.1.1 Motilidad

Al evaluar la motilidad espermática se observó una disminución significativa en el porcentaje de espermatozoides móviles totales ( $P<0,001$ ) en las muestras refrigeradas (con y sin hormona) en comparación con la muestra *swim-up* (Figura 5.1). Un resultado lógico ya que, como se ha comentado, la pérdida de motilidad es uno de los efectos del *cold-shock*. Sin embargo, la adición de  $P_4$  antes de la refrigeración, dio como resultado un mayor porcentaje de espermatozoides móviles en comparación con la muestra refrigerada sin hormona (control) ( $P<0,001$  para 100 pM y 1  $\mu$ M;  $P<0,01$  para 10 nM de  $P_4$  en comparación con el control).

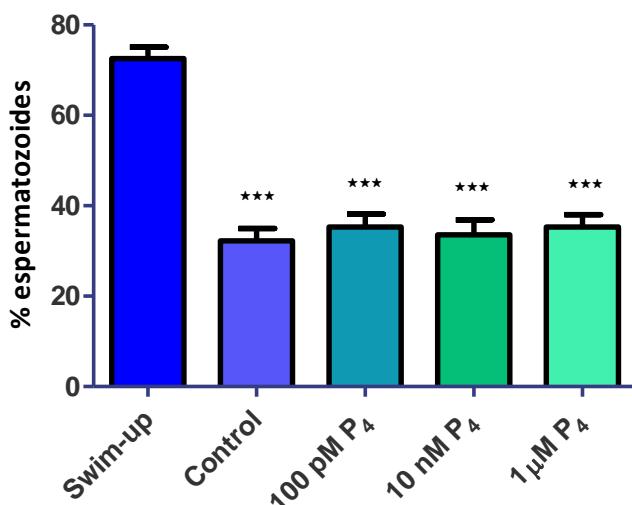
A la vista de los resultados, la progesterona parece tener un papel protector en el mantenimiento de la motilidad ante el daño por frío. Sin embargo, no se observaron efectos en el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva.



**Figura 5.1** Porcentaje de espermatozoides con motilidad total y progresiva en las muestras sin refrigerar (*swim-up*) y refrigeradas sin hormona (control) o con diferentes dosis de progesterona (100 pM, 10 nM o 1  $\mu$ M P<sub>4</sub>) añadidas previamente. Valores medios  $\pm$  error estándar (n=4). \*\*\* P<0,001 comparando con la muestra de *swim-up*, \*\*P<0,01 comparado con la muestra control, \* P<0,05 comparado con la muestra control.

### 5.1.2 Integridad de membrana

El descenso en la integridad de membrana producido por la refrigeración a 5 °C (Figura 5.2), fue todavía más acusado que en la motilidad. Nuevamente se observan diferencias significativas entre las muestras refrigeradas frente al *swim-up* (P<0,001) aunque, en este caso, ninguna de las concentraciones de hormona usadas parece capaz de proteger frente a este daño por frío (las diferencias entre las muestras refrigeradas con hormona con respecto a la muestra refrigerada control no son significativas).



**Figura 1** Porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra en muestras sin refrigerar (*swim-up*) y refrigeradas sin hormona (control) o con diferentes dosis de progesterona (100 pM, 10 nM ó 1  $\mu$ M P<sub>4</sub>) añadidas previamente. Valores medios  $\pm$  error estándar (n=4). \*\*\* P<0,001 comparando con la muestra de *swim-up*

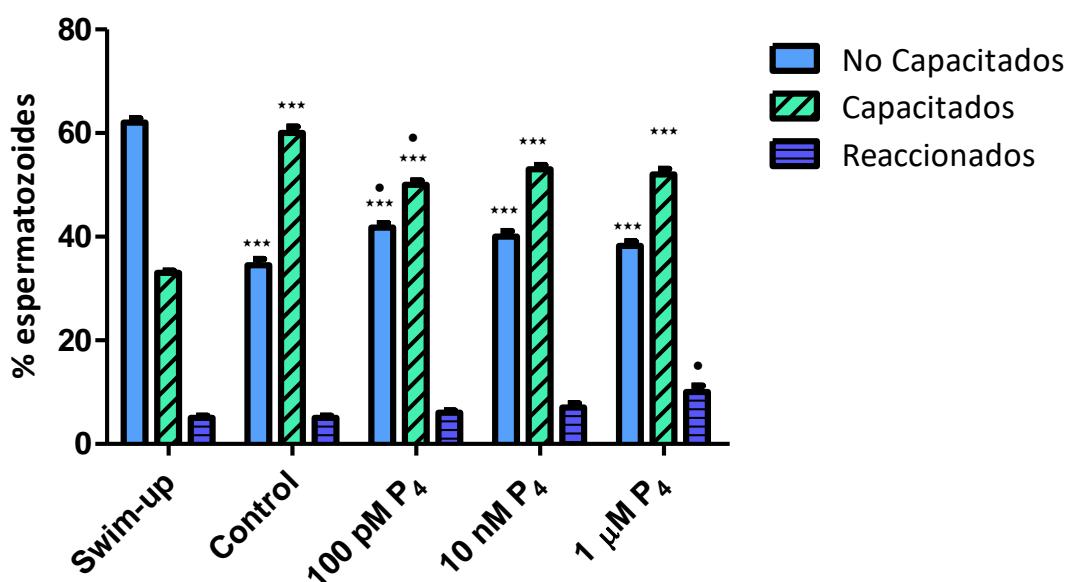
### 5.1.3 Estado de capacitación

Al someter muestras espermáticas a refrigeración, los espermatozoides sufren modificaciones en la membrana de la cabeza del espermatozoide debido a la redistribución de fosfolípidos y a la salida de colesterol (Langlais *et al.*, 1981). Así pues, son más reactivos y quedan en un estado parcialmente capacitado (Watson, 1995); fenómeno conocido como criocapacitación.

#### 5.1.3.1 Tinción con clorotetraciclina

Al evaluar el estado de capacitación mediante la tinción con CTC, sí se observaron diferencias significativas ( $P<0,05$ ) entre las muestras refrigeradas con y sin progesterona (Figura 5.3). La adición de progesterona a una concentración final de 100 pM antes de la refrigeración, mantuvo 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 frente a la criocapacitación o capacitación prematura asociada al frío.

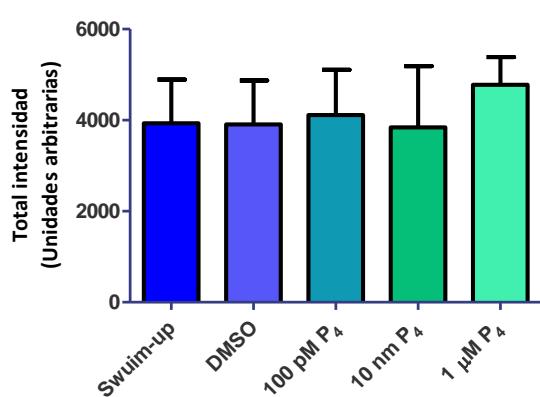
En cuanto a los espermatozoides reaccionados, parecen aumentar de forma significativa ( $P<0,05$ ) a una concentración de  $P_4$  de 1  $\mu\text{M}$  con respecto al control (Figura 5.3). Los resultados corroboran los obtenidos recientemente en la especie ovina por nuestro grupo de investigación (Gimeno-Martos *et al.*, 2017) y están en concordancia con los descritos en otras especies de mamíferos acerca del papel de la  $P_4$  como inductor de la reacción acrosómica (Witte and Schafer-Somi, 2007 ; Baldi *et al.*, 2009).



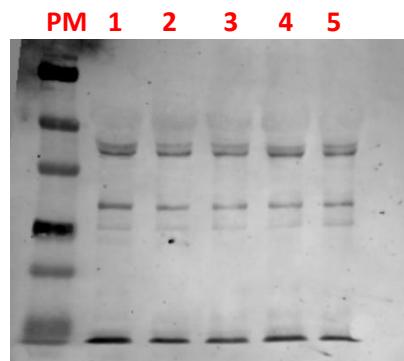
**Figura 5.3** Porcentaje de espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados en muestras sin refrigerar (*swim-up*) y refrigeradas sin hormona (control) o con diferentes dosis de progesterona (100 pM, 10 nM o 1  $\mu\text{M}$   $P_4$ ) añadidas previamente. Valores medios  $\pm$  error estándar ( $n=4$ ). \*\*\*  $P<0,001$  comparando con la muestra de *swim-up*, •  $P<0,05$  comparando con la muestra control.

### 5.1.3.2 Evaluación de la fosforilación en residuos de tirosinas

La fosforilación en residuos de tirosina de las proteínas de membrana plasmática es un evento asociado a la capacitación espermática (Grasa *et al.*, 2006). En este estudio, el porcentaje de espermatozoides capacitados se vio disminuido al incubar las muestras refrigeradas con una concentración de P<sub>4</sub> de 100 pM con respecto al control refrigerado (Figura 5.3). Sin embargo, no se observaron cambios en la fosforilación de residuos de tirosina (Figura 5.4). Esto se explicaría porque la capacitación es un proceso secuencial que implica varias rutas de señalización, y un compuesto puede tener efecto sobre una de las manifestaciones del proceso, como el cambio en la localización intracelular del calcio evidenciado por la tinción con CTC, y no sobre otras.



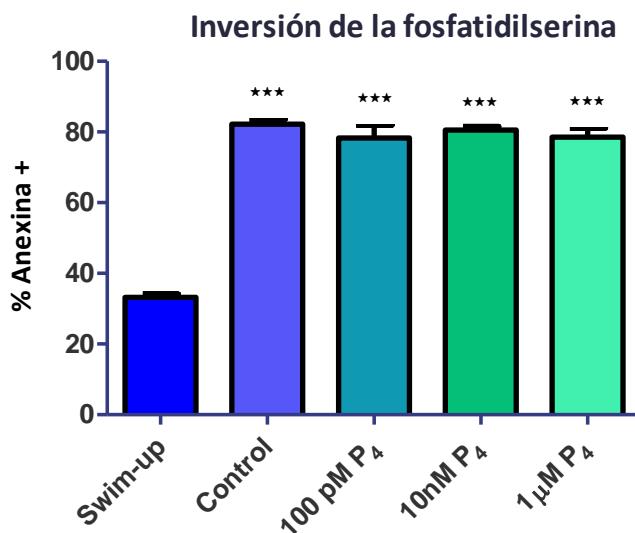
**Figura 5.4** Cuantificación por densitometría del total de proteínas fosforiladas en tirosinas en muestras sin refrigerar (*swim-up*) y refrigeradas sin hormona (control) o con diferentes dosis de progesterona (100 pM, 10 nM o 1 μM P<sub>4</sub>) añadidas previamente. Valores medios ± error estándar (n=3)



**Figura 5.5** Westernblot representativo de los obtenidos con anticuerpos antifosforiloínsina de proteínas extraídas de espermatozoides de las muestras sin refrigerar (*swim-up* (1)) y refrigeradas sin hormona (control (2)) o con diferentes dosis de progesterona (100 pM (3), 10 nM (4) o 1 μM (5) P<sub>4</sub>) añadidas previamente. PM= marcador de peso molecular de 10 a 250 kDa.

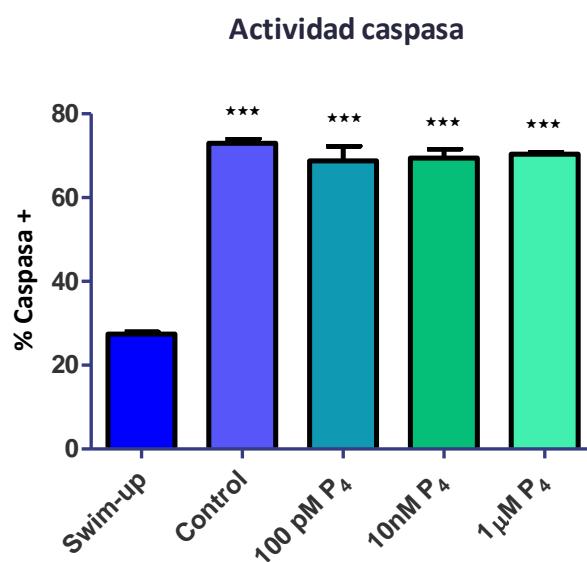
### 5.1.4 Marcadores apoptóticos

El primero de los marcadores apoptóticos analizados, la inversión de la fosfatidilserina, no mostró diferencias significativas entre las muestras refrigeradas con y sin hormona. Únicamente se observó un aumento significativo (P<0,001) del porcentaje de espermatozoides positivos para este marcador al refrigerar las muestras (Figura 5.6).



**Figura 5.6** Porcentaje de espermatozoides con inversión de fosfatidilserina (anexina +) en muestras sin refrigerar (*swim-up*) y refrigeradas sin hormona (control) o con diferentes dosis de progesterona (100 pM, 10 nM o 1 μM P<sub>4</sub>) añadidas previamente. Valores medios ± error estándar (n=4). \*\*\* P<0,001 comparando con la muestra de *swim-up*.

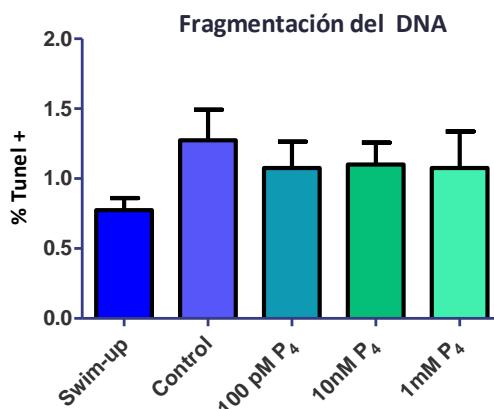
Cuando se analizó el porcentaje de espermatozoides con caspasas activas, se observó un aumento significativo (P<0,001) del porcentaje de espermatozoides con actividad caspasa tras la refrigeración, es decir, un aumento de caspasas activas (Figura 5.7). Las diferencias entre las muestras refrigeradas con hormona y las muestras refrigeradas control son mínimas y, en cualquier caso, no significativas.



**Figura 5.7** Porcentaje de espermatozoides con caspasas activas (caspase +) en muestras sin refrigerar (*swim-up*) y refrigeradas sin hormona (control) o con diferentes dosis de progesterona (100 pM, 10 nM o 1 μM P<sub>4</sub>) añadidas previamente. Valores medios ± error estándar (n=4). \*\*\* P<0,001 comparando con la muestra de *swim-up*.

Los resultados de estos marcadores (Figura 5.6 y Figura 5.7), corroboran uno de los efectos descritos del *cold-shock* sobre los espermatozoides; el aumento de los parámetros apoptóticos (Del Valle *et al.*, 2010).

Los resultados del tercer marcador apoptótico analizado (Figura 5.8), la fragmentación del DNA, no muestran diferencias significativas entre las muestras sometidas a 5 °C durante 10 minutos ni en comparación con el *swim-up*. Una posible explicación a estos resultados, podría ser que el choque térmico sea tan corto en cuanto a duración que apenas da tiempo a desencadenar los mecanismos de daño en el DNA por frío.



**Figura 5.8** Porcentaje de espermatozoides con fragmentación del DNA (Tunel +) en muestras sin refrigerar (*swim-up*) y refrigeradas sin hormona (control) o con diferentes dosis de progesterona (100 pM, 10 nM o 1 μM P<sub>4</sub>) añadidas previamente. Valores medios ± error estándar (n=4).

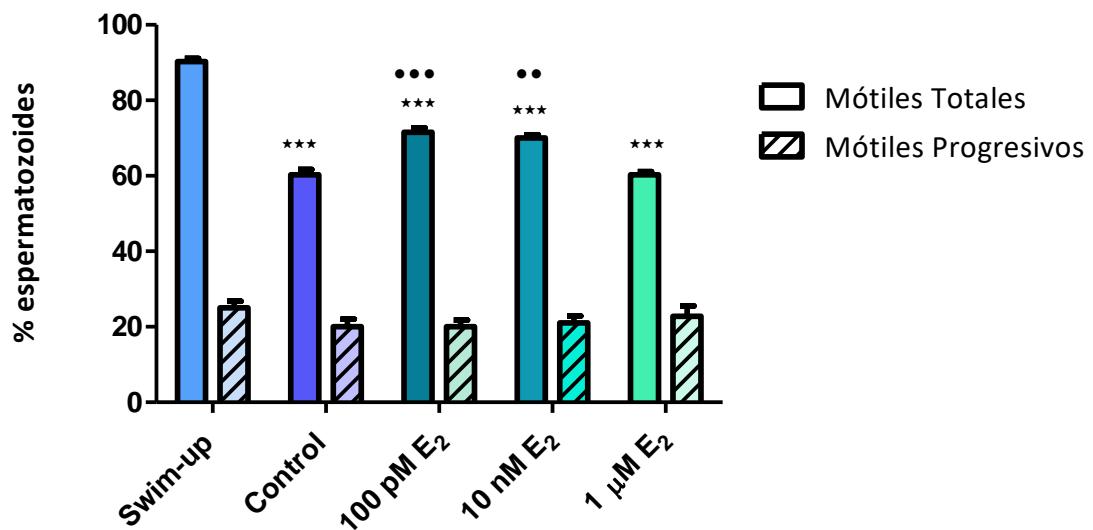
## 5.2 EFECTO DE LA ADICIÓN PREVIA DE DIFERENTES DOSIS DE ESTRADIOL SOBRE ESPERMATOZOIDES SOMETIDOS A REFRIGERACIÓN

De la misma forma que para la progesterona, se analizó el efecto de diferentes dosis de estradiol (100 pM, 10 nM y 1 μM) añadidas a los espermatozoides ovino antes de ser refrigerados de forma brusca (*cold-shock*) a 5 °C durante 10 minutos. Se evaluaron cambios en la motilidad, la integridad de membrana, el estado de capacitación y los parámetros apoptóticos.

### 5.2.1 Motilidad

Al evaluar la motilidad espermática se observó una disminución significativa en el porcentaje de espermatozoides móviles totales (P<0,001) en las muestras refrigeradas (con y sin hormona) en comparación con la muestra *swim-up* (Figura 5.9). Sin embargo, la adición de E<sub>2</sub> antes de la refrigeración a unas concentraciones finales de 100 pM y 10 nM, dio como resultado un mayor porcentaje de espermatozoides móviles en comparación con la muestra refrigerada sin hormona (control) (P<0,001 y P<0,01 respectivamente).

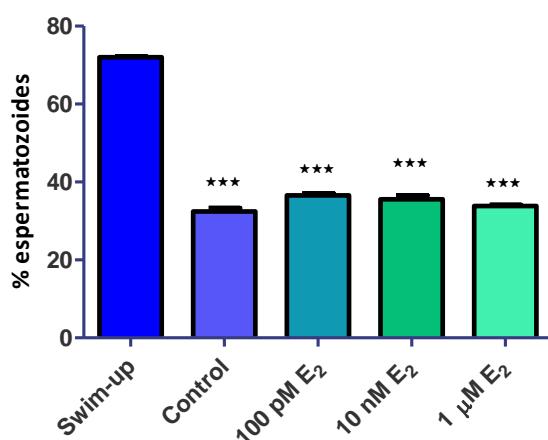
A la vista de los resultados, el estradiol parece tener un papel protector en el mantenimiento de la motilidad ante el daño por frío. Sin embargo, al igual que ocurría en el estudio de progesterona, no se observaron efectos en el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva.



**Figura 5.9** Porcentaje de espermatozoides con motilidad total y progresiva en las muestras sin refrigerar (*swim-up*) y refrigeradas sin hormona (control) o con diferentes dosis de estradiol (100 pM, 10 nM ó 1  $\mu$ M E<sub>2</sub>) añadidas previamente. Valores medios  $\pm$  error estándar (n=4). \*\*\* P<0,001 comparando con la muestra de *swim-up*, \*\*\*P<0,001 comparado con la muestra control, \*\* P<0,01 comparado con la muestra control.

### 5.2.2 Integridad de membrana

El descenso en la integridad de membrana producido por la refrigeración a 5 °C (Figura 5.10), fue notablemente significativo (P<0,001). Sin embargo, al igual que ocurría en el caso de la P<sub>4</sub>, ninguna de las concentraciones de hormona usadas parece capaz de proteger frente a este daño por frío (las diferencias entre las muestras refrigeradas con hormona con respecto a la muestra refrigerada control no son significativas).

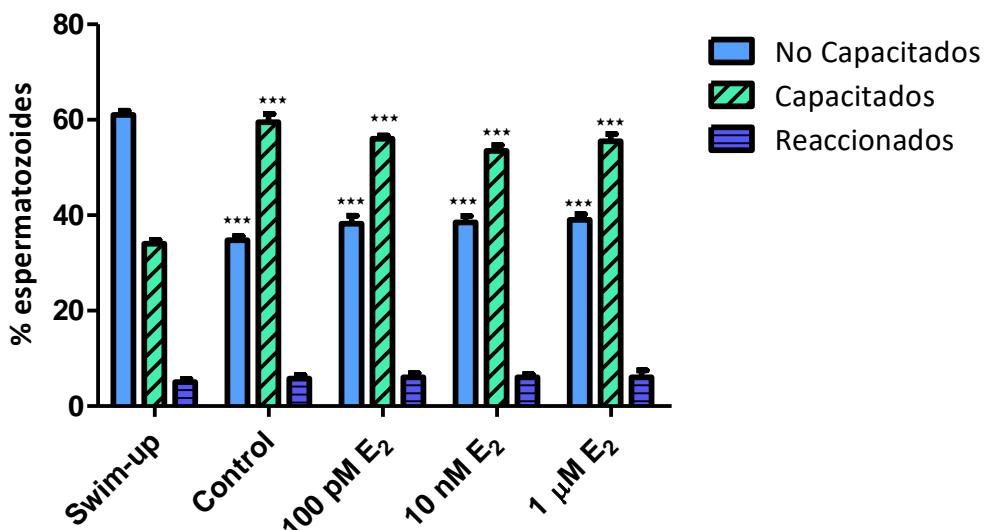


**Figura 5.10** Porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra en muestras sin refrigerar (*swim-up*) y refrigeradas sin hormona (control) o con diferentes dosis de estradiol (100 pM, 10 nM ó 1  $\mu$ M E<sub>2</sub>) añadidas previamente. Valores medios  $\pm$  error estándar (n=4). \*\*\* P<0,001 comparando con la muestra de *swim-up*.

## 5.2.3 Estado de capacitación

### 5.2.3.1 Tinción con clorotetraciclina

Al evaluar el estado de capacitación mediante la tinción con CTC se observó el efecto criocapacitante, producido por el *cold-shock*, tal y como se observa en la Figura 5.11. A diferencia de lo observado al incubar con P<sub>4</sub>, la adición de E<sub>2</sub> no refleja cambios significativos en ninguna de las tres concentraciones usadas.

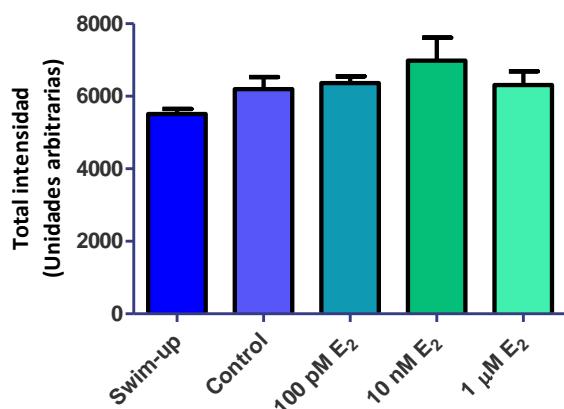


**Figura 5.11** Porcentaje de espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados en muestras sin refrigerar (*swim-up*) y refrigeradas sin hormona (control) o con diferentes dosis de estradiol (100 pM, 10 nM o 1 μM E<sub>2</sub>) añadidas previamente. Valores medios ± error estándar (n=4). \*\*\* P<0,001 comparando con la muestra de *swim-up*.

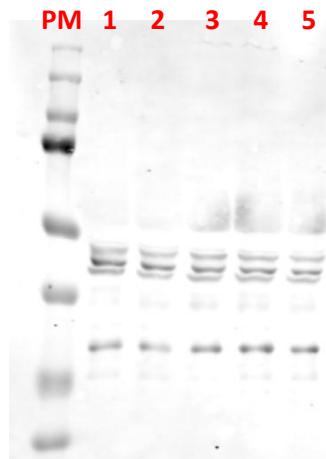
### 5.2.3.2 Evaluación de la fosforilación en residuos de tirosinas

Al evaluar la fosforilación en residuos de tirosinas, no se apreciaron diferencias significativas entre las distintas muestras tal y como se observa en la Figura 5.12.

De igual forma que ocurría para la P<sub>4</sub>, esto podría explicarse ya que la capacitación es un proceso secuencial que implica varias rutas de señalización, y un compuesto puede tener efecto sobre una de las manifestaciones del proceso, como el cambio en la localización intracelular del calcio evidenciado por la tinción con CTC, y no sobre otras.



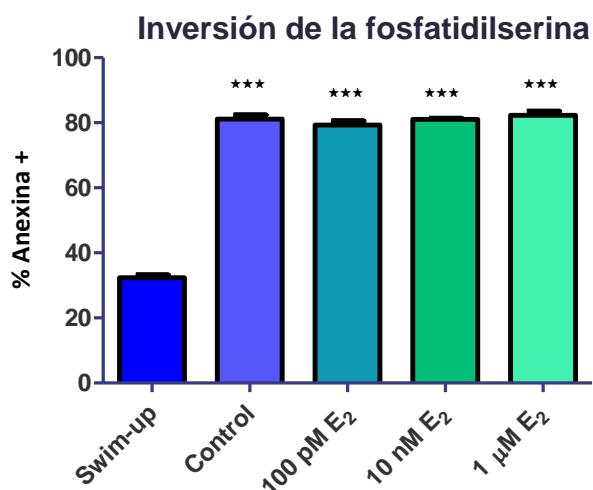
**Figura 5.12** Cuantificación por densitometría del total de proteínas fosforiladas en tirosinas en muestras sin refrigerar (*swim-up*) y refrigeradas sin hormona (control) o con diferentes dosis de estradiolprogesterona (100 pM, 10 nM o 1  $\mu$ M E<sub>2</sub>) añadidas previamente. Valores medios  $\pm$  error estándar (n=3)



**Figura 5.13** Westernblot representativo de los obtenidos con anticuerpos antifosforoínsina de proteínas extraídas de espermatozoides de las muestras sin refrigerar (*swim-up* (1)) y refrigeradas sin hormona (control (2)) o con diferentes dosis de progesterona (100 pM (3), 10 nM (4) o 1  $\mu$ M (5) E<sub>2</sub>) añadidas previamente. PM= marcador de peso molecular de 10 a 250 kDa.

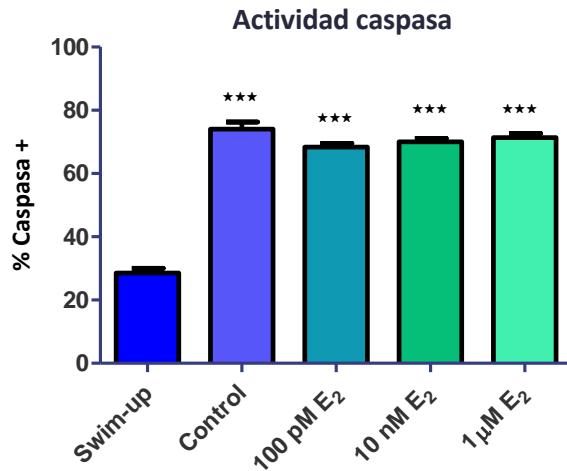
#### 5.2.4 Marcadores apoptóticos

Cuando se analizó la inversión de la fosfatidilserina, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides con inversión entre las muestras refrigeradas con y sin hormona. Únicamente se observó un aumento significativo ( $P<0,001$ ) del porcentaje de espermatozoides positivos para este marcador al refrigerar las muestras (Figura 5.14).



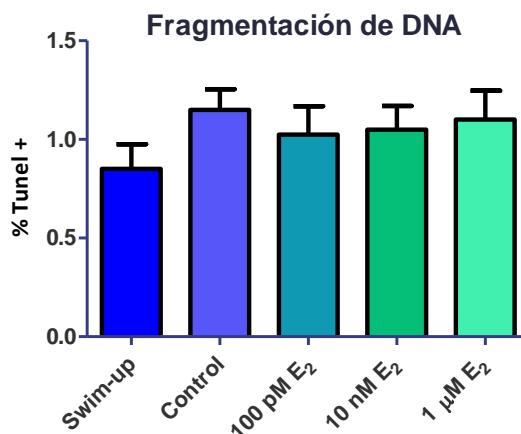
**Figura 5.14** Porcentaje de espermatozoides con inversión de fosfatidilserina (anexina +) en muestras sin refrigerar (*swim-up*) y refrigeradas sin hormona (control) o con diferentes dosis de estradiol (100 pM, 10 nM o 1  $\mu$ M E<sub>2</sub>) añadidas previamente. Valores medios  $\pm$  error estándar (n=4). \*\*\*  $P<0,001$  comparando con la muestra de *swim-up*.

Al analizar el porcentaje de células con caspasas activas, también se observó un aumento significativo ( $P<0,001$ ) de este marcador apoptótico tras la refrigeración (Figura 5.15). Sin embargo, las diferencias entre las muestras refrigeradas con hormona y las muestras refrigeradas control no fueron significativas.



**Figura 5.15** Porcentaje de espermatozoides con caspasas activas (caspase +) en muestras sin refrigerar (*swim-up*) y refrigeradas sin hormona (control) o con diferentes dosis de estradiol (100 pM, 10 nM o 1  $\mu$ M E<sub>2</sub>) añadidas previamente. Valores medios  $\pm$  error estándar ( $n=4$ ). \*\*\*  $P<0,001$  comparando con la muestra de *swim-up*.

Sin embargo, cuando se analizó la fragmentación del DNA, no se observaron diferencias significativas entre las muestras refrigeradas y sin refrigerar (Figura 5.16). De la misma forma que ocurría en los resultados vistos para la P<sub>4</sub> (Figura 5.8), una posible explicación sería la corta duración del tratamiento de refrigeración que apenas da tiempo a desencadenar los mecanismos de daño en el DNA por frío. La incubación previa con E<sub>2</sub> no dio lugar a ninguna diferencia en el porcentaje de espermatozoides con DNA dañado.



**Figura 5.16** Porcentaje de espermatozoides con fragmentación del DNA (Tunel +) en muestras sin refrigerar (*swim-up*) y refrigeradas sin hormona (control) o con diferentes dosis de estradiol (100 pM, 10 nM o 1  $\mu$ M E<sub>2</sub>) añadidas previamente. Valores medios  $\pm$  error estándar ( $n=4$ ).

## 6. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se extraen de este trabajo en base a los resultados obtenidos se enumeran a continuación:

- La progesterona, añadida a una concentración de 100 pM, 10 nM y 1 µM antes de la refrigeración, aumenta de manera significativa la motilidad con respecto a la muestra refrigerada control, ejerciendo así un papel protector frente al daño por frío.
- La progesterona, añadida a una concentración de 100 pM 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.
- El estradiol, añadido a una concentración de 100 pM y 10 nM antes de la refrigeración, aumenta de manera significativa la motilidad con respecto a la muestra refrigerada control, ejerciendo así un papel protector frente al daño por frío.
- Ni la progesterona ni el estradiol parecen tener efecto protector frente al incremento de los marcadores apoptóticos inducidos por el choque térmico (*cold-shock*).

## CONCLUSIONS

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

- Progesterone added at concentration 100 pM, 10 nM and 1 µM before *cold-shock*, increases significantly the motility compared to the control cooled sample, thereby showing a protective role against cold damage.
- Progesterone added at concentration 100 pM before *cold-shock*, reduces significantly some of the events related to cryocapacitation such as intracellular calcium distribution evaluated by CTC.
- Estradiol added at concentration 100pM and 10 nM before *cold-shock*, increases significantly the motility compared to the control cooled sample, thereby showing a protective role against cold damage.
- Neither progesterone nor estradiol appears to have a protective effect against the increase of apoptotic markers induced by *cold-shock*.

## 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." *Human Reproduction (Oxford, England)* 8 (7): 1087–92.
- 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." *Journal of Andrology* 13 (3): 232–41.
- Anzar, Muhammad, Liwei He, Mary M. Buhr, Thomas G. Kroetsch, and Karl P. Pauls. 2002. "Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility." *Biology of Reproduction* 66 (2): 354–60.
- Aquila, Saveria, Diego Sisci, Mariaelena Gentile, Emilia Middea, Stefania Catalano, Amalia Carpino, Vittoria Rago, and Sebastiano Ando. 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." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89 (3): 1443–51.
- Arkoun, Brahim, Camille Gautier, Christelle Delalande, Isabelle Barrier-Battut, Isabelle Guenon, Didier Goux, and Helene Bouraima-Lelong. 2014. "Stallion Spermatozoa: Putative Target of Estrogens; Presence of the Estrogen Receptors ESR1, ESR2 and Identification of the Estrogen-Membrane Receptor GPER." *General and Comparative Endocrinology* 200 (May): 35–43.
- Baldi, Elisabetta, Michaela Luconi, Monica Muratori, Sara Marchiani, Lara Tamburrino, and Gianni Forti. 2009. "Nongenomic Activation of Spermatozoa by Steroid Hormones: Facts and Fictions." *Molecular and Cellular Endocrinology* 308 (1–2): 39–46.
- Ball, B. A., V. Medina, C. G. Gravance, and J. Baumbe. 2001. "Effect of Antioxidants on Preservation of Motility, Viability and Acrosomal Integrity of Equine Spermatozoa during Storage at 5 Degrees C." *Theriogenology* 56 (4): 577–89.
- Blackshaw, A. W. & Salisbury, G. W. (1957) "Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa. 11. Cold shock and its prevention. J. Dairy Sci. **40**: 1099.
- Brouwers, Jos F., Patricia F. N. Silva, and Barend M. Gadella. 2005. "New Assays for Detection and Localization of Endogenous Lipid Peroxidation Products in Living Boar Sperm after BTS Dilution or after Freeze-Thawing." *Theriogenology* 63 (2): 458–69.

- Brum, A. M., K. Sabeur, and B. A. Ball. 2008. "Apoptotic-like Changes in Equine Spermatozoa Separated by Density-Gradient Centrifugation or after Cryopreservation." *Theriogenology* 69 (9): 1041–55.
- Chaveiro, A., P. Santos, and F. M. da Silva. 2007. "Assessment of Sperm Apoptosis in Cryopreserved Bull Semen after Swim-up Treatment: A Flow Cytometric Study." *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene* 42 (1): 17–21.
- Colas, Carmen, Peter James, Liz Howes, Roy Jones, Jose A. Cebrian-Perez, and Teresa Muino-Blanco. 2008. "Cyclic-AMP Initiates Protein Tyrosine Phosphorylation Independent of Cholesterol Efflux during Ram Sperm Capacitation." *Reproduction, Fertility, and Development* 20 (6): 649–58.
- Darin-Bennett, A., and I. G. White. 1977. "Influence of the Cholesterol Content of Mammalian Spermatozoa on Susceptibility to Cold-Shock." *Cryobiology* 14 (4): 466–70.
- De Amicis, F., C. Guido, I. Perrotta, P. Avena, S. Panza, S. Ando, and S. Aquila. 2011. "Conventional Progesterone Receptors (PR) B and PRA Are Expressed in Human Spermatozoa and May Be Involved in the Pathophysiology of Varicocoele: A Role for Progesterone in Metabolism." *International Journal of Andrology* 34 (5 Pt 1): 430–45.
- De Amicis, F., M. Santoro, C. Guido, D. Sisci, R. Bruno, A. Carpino, and S. Aquila. 2012. "Progesterone through Progesterone Receptors Affects Survival and Metabolism of Pig Sperm." *Animal Reproduction Science* 135 (1): 75–84.
- 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 = Zuchthygiene* 45 (6): e260-268.
- Donnelly, E. T., N. McClure, and S. E. Lewis. 1999. "The Effect of Ascorbate and Alpha-Tocopherol Supplementation in Vitro on DNA Integrity and Hydrogen Peroxide-Induced DNA Damage in Human Spermatozoa." *Mutagenesis* 14 (5): 505–12.
- Gadella, Bart M., Pei-Shiue Tsai, Arjen Boerke, and Ian A. Brewis. 2008. "Sperm Head Membrane Reorganisation during Capacitation." *The International Journal of Developmental Biology* 52 (5–6): 473–80.
- García-López, N., M. Ollero, T. Muñoz-Blanco, and J.A. Cebrián-Pérez. n.d. "A Dextran Swim-up Procedure for Separation of Highly Motile and Viable Ram Spermatozoa from Seminal Plasma." *Theriogenology* 46 (1): 141–51.

- Gillan, L., G. Evans, and W. M. Maxwell. 1997. "Capacitation Status and Fertility of Fresh and Frozen-Thawed Ram Spermatozoa." *Reproduction, Fertility, and Development* 9 (5): 481–87.
- Gimeno-Martos, S., M. Gonzalez-Arto, A. Casao, M. Gallego, J. A. Cebrian-Perez, T. Muino-Blanco, and R. Perez-Pe. 2017. "Steroid Hormone Receptors and Direct Effects of Steroid Hormones on Ram Spermatozoa." *Reproduction (Cambridge, England)* 154 (4): 469–81.
- Gorczyca, W., F. Traganos, H. Jasionowska, and Z. Darzynkiewicz. 1993. "Presence of DNA Strand Breaks and Increased Sensitivity of DNA in Situ to Denaturation in Abnormal Human Sperm Cells: Analogy to Apoptosis of Somatic Cells." *Experimental Cell Research* 207 (1): 202–5.
- Grasa, P., J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2006). "Signal Transduction Mechanisms Involved in in Vitro Ram Sperm Capacitation." *Reproduction (Cambridge, England)* 132 (5): 721–32.
- Harrison, R. A., and J. E. Flechon. 1980. "Immunocytochemical Detection of Acrosomal Damage Following Cold Shock: Loss of Acrosin from the Acrosomal Region of Ram, Bull and Boar Spermatozoa." *Reproduction, Nutrition, Developpement* 20 (6): 1801–10.
- Harrison, R. A., and S. E. Vickers. 1990. "Use of Fluorescent Probes to Assess Membrane Integrity in Mammalian Spermatozoa." *Journal of Reproduction and Fertility* 88 (1): 343–52.
- Holt, W. V., and R. D. North. 1984. "Partially Irreversible Cold-Induced Lipid Phase Transitions in Mammalian Sperm Plasma Membrane Domains: Freeze-Fracture Study." *The Journal of Experimental Zoology* 230 (3): 473–83.
- Koenig, H. L., M. Schumacher, B. Ferzaz, A. N. Thi, A. Ressources, R. Guennoun, I. Jung-Testas, P. Robel, Y. Akwa, and E. E. Baulieu. 1995. "Progesterone Synthesis and Myelin Formation by Schwann Cells." *Science (New York, N.Y.)* 268 (5216): 1500–1503.
- Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227 (5259): 680–85.
- Langlais, J., M. Zollinger, L. Plante, A. Chapdelaine, G. Bleau, and K. D. Roberts. 1981. "Localization of Cholestryll Sulfate in Human Spermatozoa in Support of a Hypothesis for the Mechanism of Capacitation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (12): 7266–70.
- Lishko, Polina V., Inna L. Botchkina, and Yuriy Kirichok. 2011. "Progesterone Activates the Principal Ca<sup>2+</sup> Channel of Human Sperm." *Nature* 471 (7338): 387–91.

- Mann, T. and Lutwak-Mann, C. (1955). Biochemical changes underlying the phenomenon of cold shock in spermatozoa. *Arch. Sci. Biol.*, 39: 578.
- 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): 113–32.
- Marti, Elena, Rosaura Perez-Pe, Teresa Muino-Blanco, and Jose A. Cebrian-Perez. 2006. "Comparative Study of Four Different Sperm Washing Methods Using Apoptotic Markers in Ram Spermatozoa." *Journal of Andrology* 27 (6): 746–53.
- çMartin, G, N Cagnon, O Sabido, B Sion, G Grizard, P Durand, and R Levy. 2007. "Kinetics of Occurrence of Some Features of Apoptosis during the Cryopreservation Process of Bovine Spermatozoa." *Human Reproduction (Oxford, England)* 22 (2): 380–88.
- Martin, Guillaume, Odile Sabido, Philippe Durand, and Rachel Levy. 2004. "Cryopreservation Induces an Apoptosis-like Mechanism in Bull Sperm." *Biology of Reproduction* 71 (1): 28–37.
- Mohamed, El-Sayed A., Yoo-Jin Park, Won-Hee Song, Dong-Ha Shin, Young-Ah You, Buom-Yong Ryu, and Myung-Geol Pang. 2011. "Xenoestrogenic Compounds Promote Capacitation and an Acrosome Reaction in Porcine Sperm." *Theriogenology* 75 (6): 1161–69.
- Mortimer, D. 1994. "Sperm Recovery Techniques to Maximize Fertilizing Capacity." *Reproduction, Fertility, and Development* 6 (1): 25–31.
- Muratori, Monica, Michaela Luconi, Sara Marchiani, Gianni Forti, and Elisabetta Baldi. 2009. "Molecular Markers of Human Sperm Functions." *International Journal of Andrology* 32 (1): 25–45.
- Oehninger, Sergio, Mahmood Morshedi, S.-L. Weng, Steve Taylor, Hakan Duran, and Stephen Beebe. 2003. "Presence and Significance of Somatic Cell Apoptosis Markers in Human Ejaculated Spermatozoa." *Reproductive Biomedicine Online* 7 (4): 469–76.
- 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." *International Journal of Andrology* 19 (5): 287–92.
- O'Malley, B. W., and M. J. Tsai. 1992. "Molecular Pathways of Steroid Receptor Action." *Biology of Reproduction* 46 (2): 163–67.
- Ortega-Ferrusola, C., B. Macias Garcia, J. M. Gallardo-Bolanos, L. Gonzalez-Fernandez, H. Rodriguez-Martinez, J. A. Tapia, and F. J. Pena. 2009. "Apoptotic Markers Can Be Used to Forecast the Freezeability of Stallion Spermatozoa." *Animal Reproduction Science* 114 (4): 393–403.

- Paasch, Uwe, Rakesh K. Sharma, Akshay K. Gupta, Sonja Grunewald, Edward J. Mascha, Anthony J. Jr Thomas, H.-J. Glander, and Ashok Agarwal. 2004. "Cryopreservation and Thawing Is Associated with Varying Extent of Activation of Apoptotic Machinery in Subsets of Ejaculated Human Spermatozoa." *Biology of Reproduction* 71 (6): 1828–37.
- Paula, Thais Serzedello de, Ricardo Pimenta Bertolla, Deborah Montagnini Spaine, Maria Adelaide Cunha, Nestor Schor, and Agnaldo Pereira Cedenho. 2006. "Effect of Cryopreservation on Sperm Apoptotic Deoxyribonucleic Acid Fragmentation in Patients with Oligozoospermia." *Fertility and Sterility* 86 (3): 597–600.
- Quinn, P. J., I. G. White, and K. W. Cleland. 1969. "Chemical and Ultrastructural Changes in Ram Spermatozoa after Washing, Cold Shock and Freezing." *Journal of Reproduction and Fertility* 18 (2): 209–20.
- Rago, V., F. Giordano, E. Brunelli, D. Zito, S. Aquila, and A. Carpino. 2014. "Identification of G Protein-Coupled Estrogen Receptor in Human and Pig Spermatozoa." *Journal of Anatomy* 224 (6): 732–36.
- Robertson, L., and P. F. Watson. 1986. "Calcium Transport in Diluted or Cooled Ram Semen." *Journal of Reproduction and Fertility* 77 (1): 177–85.
- Russell, Lonnie D., Helio Chiarini-Garcia, Stanley J. Korsmeyer, and C. Michael Knudson. 2002. "Bax-Dependent Spermatogonia Apoptosis Is Required for Testicular Development and Spermatogenesis." *Biology of Reproduction* 66 (4): 950–58.
- Sagare-Patil, V., M. Galvankar, M. Satiya, B. Bhandari, S. K. Gupta, and D. Modi. 2012. "Differential Concentration and Time Dependent Effects of Progesterone on Kinase Activity, Hyperactivation and Acrosome Reaction in Human Spermatozoa." *International Journal of Andrology* 35 (5): 633–44.
- Said, Tamer, Ashok Agarwal, Sonja Grunewald, Manja Rasch, Thomas Baumann, Christian Kriegel, Liang Li, Hans-Juergen Glander, Anthony J. Jr Thomas, and Uwe Paasch. 2006. "Selection of Nonapoptotic Spermatozoa as a New Tool for Enhancing Assisted Reproduction Outcomes: An in Vitro Model." *Biology of Reproduction* 74 (3): 530–37.
- Sakkas, Denny, Emre Seli, Gian Carlo Manicardi, Martine Nijs, William Ombelet, and Davide Bizzaro. 2004. "The Presence of Abnormal Spermatozoa in the Ejaculate: Did Apoptosis Fail?" *Human Fertility (Cambridge, England)* 7 (2): 99–103.
- Sebkova, Natasa, Martina Cerna, Lukas Ded, Jana Peknicova, and Katerina Dvorakova-Hortova. 2012. "The Slower the Better: How Sperm Capacitation and Acrosome Reaction Is Modified in the Presence of Estrogens." *Reproduction (Cambridge, England)* 143 (3): 297–307.

- Sinchak, Kevin, and Edward J. Wagner. 2012. "Estradiol Signaling in the Regulation of Reproduction and Energy Balance." *Frontiers in Neuroendocrinology* 33 (4): 342–63.
- Tausk, M., ed. Pharmacology of the endocrine system and related drugs: progesterone, progestational drugs and antifertility agents. Vol. 1. New York, Pergamon Press, 1971. (International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics, Section 48) p. 367-373
- Taylor, S. L., S. L. Weng, P. Fox, E. H. Duran, M. S. Morshedi, S. Oehninger, and S. J. Beebe. 2004. "Somatic Cell Apoptosis Markers and Pathways in Human Ejaculated Sperm: Potential Utility as Indicators of Sperm Quality." *Molecular Human Reproduction* 10 (11): 825–34.
- Tulsiani, Daulat R. P., Hai-Tao Zeng, and Aida Abou-Haila. 2007. "Biology of Sperm Capacitation: Evidence for Multiple Signalling Pathways." *Society of Reproduction and Fertility Supplement* 63: 257–72.
- Vigil, P., A. Toro, and A. Godoy. 2008. "Physiological Action of Oestradiol on the Acrosome Reaction in Human Spermatozoa." *Andrologia* 40 (3): 146–51. Wales, R.G. and White, I.G. (1959). "The susceptibility of spermatozoa to temperature shock". *J. Endocrin.* 19: 211-220.
- Wang, Y., R. Storeng, P. O. Dale, T. Abyholm, and T. Tanbo. 2001. Ward, C. R., and B. T. Storey. 1984. "Determination of the Time Course of Capacitation in Mouse Spermatozoa Using a Chlortetracycline Fluorescence Assay." *Developmental Biology* 104 (2): 287–96.
- Watson, P. F. 1995. "Recent Developments and Concepts in the Cryopreservation of Spermatozoa and the Assessment of Their Post-Thawing Function." *Reproduction, Fertility, and Development* 7 (4): 871–91.
- Developmental Biology* 104 (2): 287–96.
- Watson, P. F. 1995. "Recent Developments and Concepts in the Cryopreservation of Spermatozoa and the Assessment of Their Post-Thawing Function." *Reproduction, Fertility, and Development* 7 (4): 871–91.
- 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.
- White, I. G. 1993. "Lipids and Calcium Uptake of Sperm in Relation to Cold Shock and Preservation: A Review." *Reproduction, Fertility, and Development* 5 (6): 639–58.
- Witte, Tanja Semira, and Sabine Schafer-Somi. 2007. "Involvement of Cholesterol, Calcium and Progesterone in the Induction of Capacitation and Acrosome Reaction of Mammalian Spermatozoa." *Animal Reproduction Science* 102 (3–4): 181–93.