



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **FACULTAD DE VETERINARIA**

Estudio de la crioconservación y viabilidad de  
espermatozoides de epidídimo de caballo

**D. Luis Alberto Vieira**  
**2013**





Czech University of Life Sciences Prague

**Faculty of Agrobiography,  
Food and Natural Resources**

**Department of Veterinary Sciences**  
Czech University of Life Sciences Prague  
Kamýcká 129, 165 21 Prague 6 - Suchbát  
[www.af.czu.cz](http://www.af.czu.cz)

8<sup>th</sup> July 2013

Inform:

The project of Doctoral Thesis entitled "**Study of the cryopreservation capacity and viability of epididymal stallion spermatozoa**" presented by **Luis Alberto Vieira** under the research supervision of Dr. Carmen Matás and Dr. Joaquín Gadea **is evaluated positively** for the next public defence and evaluation by a jury to obtain the academic degree of Doctor by the University of Murcia with the mention "International Doctorate"

Informa:

El proyecto de tesis doctoral titulada: "**Estudio de la crioconservación y viabilidad de espermatozoides de epidídimo de caballo**" presentado por **D. Luis Alberto Vieira** bajo la dirección de la Dra. Carmen Matás Parra y del Dr. Joaquín Gadea Mateos **es evaluado positivamente**, para ser defendido en acto público ante un tribunal para obtener el grado académico de Doctor por la Universidad de Murcia con mención de "Doctorado Internacional".

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE  
FAKULTA AGROBIOLOGIE,  
POTRAVINOVÝCH A PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ  
Katedra veterinárních disciplín  
Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 - Suchbát

*Lenka Tůmová*

**Lenka Tůmová, MSc, PhD**

Assistant Professor

Department of Veterinary Sciences

Faculty of Agrobiography, Food and Natural Resources

Czech University of Life Sciences

Kamýcká 129, 165 21 Prague 6 - Suchbát

Czech Republic

Phone: +420 2 2438 2956

Fax: +420 2 3438 1841

E-mail: [tumoval@af.czu.cz](mailto:tumoval@af.czu.cz)

Este trabajo experimental ha sido financiado por la Fundación Séneca (08752/PI/08) y por MINECO y FEDER (AGL2012-40180-C03-01).

Luis Alberto Vieira disfrutó de una ayuda de movilidad de estudiantes en doctorados con mención de calidad del Ministerio de Educación 2008-2009.

Luis Alberto Vieira disfrutó de una subvención del Ministerio de Educación Cultura y Deporte para la realización de una estancia doctoral en el extranjero para la obtención de la mención internacional en el título de doctorado 2011-2012

**A mi madre Luzia Vieira**

**A mis hermanas Uribela y Mariama**

**A mi tío João Bernardo Vieira**

**A mi abuela Quinta Da Silva**

**A Eugénia Furtado**

**A toda mi familia**

**La vida no es tan corta que no haya  
siempre tiempo para la cortesía.**

**Ralph Waldo Emerson.**

## **Agradecimientos**

*Muchísimas personas han dedicado buena parte de su tiempo para acompañarme en esta lucha, que no es sólo un esfuerzo individual, algunas están cerquita y otras no tan cerca, pero independientemente de donde estén, les agradezco eternamente toda la amistad, el apoyo, la dedicación, etc... que me han brindado. Gracias por formar parte de mi vida.*

*Agradezco de todo corazón a mis directores de tesis, **Carmen** y **Joaquín**, que me han guiado y aconsejado en todo momento. Por transmitirme los conocimientos científicos, por la amistad, por la confianza que depositaron en mí, por la paciencia y por el ejemplo de humildad que siempre me demostraron. Lo que me han enseñado, me acompañará para siempre. Sin duda alguna, sin ustedes no hubiese sido posible este milagro. Cualquier agradecimiento que pudiera escribir no haría justicia para expresar mi gratitud y admiración. **Aché pa** ustedes.*

***Carmen**, gracias por haberme brindado la valiosa oportunidad de descubrir el apasionante mundo de la investigación, y la posibilidad de poder contar siempre con tu apoyo en cualquier momento. Por haberme enseñado y conducido a un buen camino, y que nuestras largas charlas influyeran benéficamente tanto a nivel profesional como personal. Sin olvidar los momentos inolvidables de nuestros tés.*

***Joaquín**, gracias por todo el apoyo y esfuerzo que has puesto en esta tesis, siempre dispuesto a ayudar y orientarme con tu visión. Quiero agradecerte también por lo mucho que me has enseñado y acompañado en todos los pasos, sin duda alguna aprendí mucho contigo. Así que no son sólo diez mil, son muchos miles más que te debo.*

***Salvador**, muchísimas gracias por todo el trato que me has dado y por tenderme la mano siempre que te he necesitado.*

***Pilar Coy**, gracias por todo el apoyo y por las infinitas oportunidades que me has brindado.*

***Rakel**, gracias por ser como eres, dispuesta a colaborar y aclararme las dudas siempre que me ha hecho falta.*

***Fran**, hemos trabajado juntos en varias ocasiones, sin duda alguna, eres un buen ejemplo a seguir. Gracias por tu apoyo y por ser tan noble.*

**Sole**, gracias por tu eterno instinto maternal, por tu preocupación y por tener tan buen corazón. Siempre tienes una palabra de aliento que anima a cualquiera.

Mi amigo **Juanito**, gracias por ser una de las piezas clave de todo esto. Siempre has estado presente. Un millón de gracias.

**Darío**, gracias por todo el apoyo y poder contar siempre contigo.

**Loli** y **Luisito** los primeros en orientarme desde que llegué a este departamento, gracias por los buenos momentos que hemos compartido. **Aitor**, gracias por tus buenos consejos. **Irenica**, gracias por poder contar siempre contigo y por tu dulce carácter. **Karen**, eres la primera en enseñarme a congelar espermatozoides de epidídimo de caballo, gracias por tu amistad y cariño chiquita. **Joni**, gracias por ser como eres, buena persona, dispuesto a ayudar y a colaborar en lo que haga falta, me has ayudado mucho compadre. **Cris**, gracias por los buenos momentos que hemos compartido, a pesar de ciertos momentos de estrés y con los nervios a flor de la piel, siempre hemos encontramos la clave para reírnos un rato. **Rebeca**, gracias por los ánimos y estar presente siempre que he necesitado de una mano amiga. **Viki**, gracias por tu colaboración. **Laura**, a pesar de tu juventud eres una auténtica profesional, agradezco muchísimo el tiempo y la paciencia que me has dedicado en las correcciones de la tesis.

A los veterinarios **Aldebarán, Nati, Diego, Pedro, Julia Weiss, Laura Gambín** y al **matadero la plana** por conseguirme los testículos y epidídimos desinteresadamente para que mis experimentos se llevaran a cabo. Muchísimas gracias.

A **Sonia Heras, Maarten Hoogewijs, Ángel Cascales y Nelly Ingram** por donarme las muestras del plasma seminal.

Gracias a todos ustedes **Lenka Tumova, Guilherme Oberlender, Ana Carina, Luiz Gustavo, Claudia Vallorani, Alejandra Mejía, Diana Turmo**. Ha sido un placer compartir con ustedes esos momentos.

**Ana Jiménez e Isabel Martínez Alcalá**, gracias por los análisis de antioxidantes.

**Dani**, gracias por tu valioso tiempo que me has dedicado en el análisis de ácidos grasos.

**Fara**, gracias por tu gran colaboración en el análisis de imagen y por hacer que todo sea tan sencillo de resolver.

**Alex**, a quien he vuelto loco con el análisis de la proteína, un millón de gracias por tu ayuda y tus buenos consejos.

**Toñi, Juana, Pepe**, gracias por todo el apoyo que me han brindado en el SACE.

A mis compis de medicina: **Blanca, María Jiménez, Wilson, Tere Zomeño, Lili, Carla Moros, Emma, Vicente, Ayrin, Salvador Acuña, Luis Miguel, Nati**, gracias por todo el apoyo y ayuda.

**Manolo Avilés**, muchísimas gracias por los buenos consejos que me has dado, por tu gran visión crítica y por poder contar con tu aclaración de dudas cuando lo he necesitado.

**Mariajo e Ivan** gracias por la amistad, el apoyo y por poder contar con ustedes.

**Noemí Atucha, Paola, José Eduardo** de Fisiología de la Facultad de Medicina, nunca se me olvida cuando empecé a medir calcio en espermatozoide. Gracias por todo el apoyo.

**Carlitos**, gracias por tu amistad y soporte informático.

A **Trinidad León Quinto**, por darme la oportunidad de trabajar en banco genético de Lince Ibérico y así permitirme conocer un campo muy importante: Animales en peligro de extinción.

Debo agradecer de manera sincera a **Ghylene Goudet** por la oportunidad y apoyo que me ha brindado en Francia durante mi estancia doctoral. A **Cécile Lahuec Douet** por su voluntad en apoyarme en cada momento en el laboratorio.

**Cadu, Helder, Baldés**, a mis amigos que siempre han estado presentes, por ejemplo de compañerismo, en fin. Es un alivio tenerles como amigo. Gracias por poder contar con ustedes.

A mi gran amiga **Eugénia Furtado** por su desinteresado apoyo, consejos y amistad, es un honor tenerte como amiga.

**Mati**, gracias por todo lo que hemos compartido, por tu apoyo incondicional sin preguntar que iba a recibir a cambio. Eres y seguirás siendo una persona muy especial en mi vida.

*Mis compis de la granja (Kassia, Christian, Willy, Diego, Livia, Tito, Jorge Daniel, Fina, Paco, Mariano, Sandra, Mari Carmen, Silvia Dalmasso, Isis, Susana, Paty, Pati Cumbe, Lidianne, Jorge Luis), gracias a todos por la amistad y el cariño.*

*Fer, Bea Muries, Gustavo, Carlos (Panamá), Beatriz López, Silvi, Delvis, Pilar Olivares por compartir buenos e inolvidable momentos con ustedes. A Laura Martínez, Mariló, María Vera, África, Hildebrando, Manuela, Flores, Stephanie Carambat gracias por los ánimos y por la infinita amistad.*

*Carmenchu, Johi y Amanda, hicieron que mi estancia en Francia fuera algo lindo e inolvidable. Muchísimas gracias por la amistad y el cariño, siempre estuvieron preocupadas conmigo.*

*A mis hermanitas, Mariama y Uribela, a pesar de la distancia siempre han estado presente en todo momento.*

*A mi tío João Bernardo Vieira por haber sido una figura muy importante en mi vida.*

*A mi abuela Quinta Da Silva que siempre me sentido querido y protegido entre tus brazos.*

*A mi madre Luzia Vieira que fue pilar fundamental en mi formación y educación como persona, y que desde muy pequeño no paraba de repetir una y otra vez que lo único que tenemos seguro y de lo que nos podemos agarrar son los estudios y que desgraciadamente no vive para ver hasta donde pude llegar por sus buenos consejos.*

*A todo el colectivo del departamento de Fisiología Veterinaria por haberme brindado lo que muy pocas personas disponen "la oportunidad de luchar y aprender" y el ejemplo de humildad que todo ser humano debe tener. Sin olvidarme de la Universidad de Murcia y la Granja Veterinaria (residencia estudiantil) por permitir mi estancia el tiempo que ha hecho falta, al Ministerio de Educación por concederme las ayudas que me permitieron hacer estancias y a este maravilloso país (España) por acogerme como uno más.*

*A todas las personas que han dedicado un tiempcito de su vida en compartir una buena charla conmigo, en aclararme una duda, o en recordarme simplemente que la vida es bella y que todo el sacrificio tiene su recompensa. Muchísimas graciasssss.*

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	5
3. INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	8
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	14
4.1. Espermatozoides.....	14
4.2. Composición de la membrana del espermatozoide.....	17
4.2.1 Composición lipídica.....	18
4.2.1.1. Fosfolípidos.....	18
4.2.1.2. Colesterol.....	19
4.2.1.3. Lípidos neutros.....	19
4.2.1.4. Balsas lipídicas.....	20
4.2.1.5. Glicolípidos.....	20
4.2.2. Composición proteica.....	21
4.2.2.1. Glicoproteínas.....	22
4.2.2.2. Glicocalix.....	23
4.3. Movilidad y fluidez de la membrana plasmática.....	23
4.4. Núcleo espermático. Cromatina.....	25
4.5. Epidídimo.....	27
4.5.1. Estructura del epidídimo.....	27
4.5.2. Función del epidídimo.....	29
4.5.2.1. Protección.....	30
4.5.2.2. Transporte de espermatozoides en el epidídimo.....	31

4.5.2.3. Concentración.....	32
4.5.2.4. Maduración.....	32
4.6. Plasma seminal.....	33
4.6.1. Proteínas de plasma seminal y sus funciones.....	34
4.6.2. Ácidos grasos del plasma seminal.....	40
4.6.3. Obtención de espermatozoides de epidídimo.....	40
4.7. El uso del espermatozoide de epidídimo en caballo y en otras especies domésticas, salvajes y en las especies en peligro de extinción.....	41
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
5.1. Medios y soluciones de manipulación de gametos.....	46
5.1.1. Medio de manipulación de espermatozoides de epidídimo de caballo (TALP modificado).....	46
5.1.2. Tampón Fosfato salino de Dulbecco (PBS).....	47
5.1.3. Preparación de las soluciones de Percoll® para selección y lavado espermático.....	48
5.1.4. Medio de congelación espermática.....	50
5.1.5. Medio de transporte y lavado del material biológico.....	50
5.1.6. Medio de obtención y de manipulación de ovocitos bovinos.....	51
5.1.7. Medio de maduración in vitro de ovocitos bovinos.....	51
5.1.8. Medio de lavado y preparación de los espermatozoides (Sperm—TALP).....	51
5.1.9. Medio de fecundación in vitro (FIV-TALP).....	51
5.2. Material biológico.....	54
5.2.1. Obtención de los espermatozoides epididimarios.....	55
5.2.2. Obtención del plasma seminal.....	55
5.3. Técnicas utilizadas para la evaluación de la calidad espermática.....	56
5.3.1. Volumen del fluido epididimario.....	56
5.3.2. Concentración espermática.....	57
5.3.3. Viabilidad espermática.....	57
5.3.4. Análisis de la fosforilación de tirosina de proteínas.....	58

5.3.5. Evaluación de la calidad espermática mediante citometría de flujo.....	59
5.3.5.1. Integridad del acrosoma.....	59
5.3.5.2. Medición de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	60
5.3.5.3. Determinación de la condensación de la cromatina.....	61
5.3.6. Evaluación de la capacidad fecundante mediante técnicas de fecundación in vitro (FIV e ICSI en sistemas heterólogos).....	62
5.3.6.1. Obtención de ovocitos bovinos y maduración in vitro.....	62
5.3.6.2. Preparación de los espermatozoides de epidídimo de caballo para ICSI y FIV.....	64
5.3.6.3. Fecundación in vitro.....	65
5.3.6.4. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).....	66
5.4. Evaluación de FIV e ICSI mediante microscopio de fluorescencia.....	67
5.5. Congelación espermática.....	68
5.5.1. Fase de enfriamiento, dilución y estabilización (4°C).....	68
5.5.2. Envasado.....	70
5.5.3. Congelación espermática.....	69
5.6. Descongelación.....	70
5.7. Determinación de la capacidad antioxidante, composición de los ácidos grasos y proteínas del plasma seminal.....	69
5.7.1. Capacidad antioxidante total del plasma seminal.....	70
5.7.2. Composición en ácidos grasos del plasma seminal.....	70
5.7.3. Análisis de la composición proteica del plasma seminal.....	71
5.7.3.1. Concentración de proteínas.....	72
5.7.3.2. Electroforesis en gel en una dimensión.....	72
5.7.3.2.1. Tinción de plata.....	74
5.7.3.2.2. Tinción de azul de Coomassie.....	76
5.7.3.2.3. Análisis proteico mediante electroforesis capilar.....	77
5.7.3.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida en dos dimensiones 2D.....	79
5.7.3.4. Electroforesis bidimensional diferencial (sistema 2D-DIGE).....	79
5.7.3.4.1. Marcaje de las muestras con las sondas.....	79

5.7.3.5. Identificación de proteínas.....	83
5.8. Diseño experimental.....	86
5.8.1. Experiencia 1. Estudio del efecto del tiempo de conservación del epidídimo en refrigeración a 4°C (0, 24, 48, 72 y 96 horas) sobre la calidad espermática antes y después de la congelación.....	86
5.8.2. Experiencia 2. Efecto de la incubación de los espermatozoides de epidídimo con plasma seminal antes de la congelación sobre la calidad espermática post descongelación.....	89
5.8.3. Experiencia 3. Caracterización del plasma seminal de caballos: proteínas capacidad antioxidante y ácidos grasos.....	91
5.9. Análisis estadístico.....	91
6. RESULTADOS.....	93
6.1. Experiencia 1. Estudio del efecto del tiempo de conservación del epidídimo (0, 24, 48, 72 y 96 horas) a 4°C sobre la calidad espermática antes y después de la congelación	
6.1.1. Volumen del fluido epididimario y concentración espermática.....	93
6.1.2. Viabilidad espermática.....	93
6.1.3. Condensación de la cromatina.....	95
6.1.4. Evaluación de la viabilidad e integridad acrosomal.....	97
6.1.5. Generación de las especies reactivas de oxígeno (ROS).....	98
6.1.6. Localización de la fosforilación de la tirosina.....	99
6.1.7. Fecundación heteróloga ICSI e FIV.....	100
6.2. Experiencia 2. Efecto de la incubación de espermatozoides de epidídimo durante 30 minutos con plasma seminal procedente de diferentes machos sobre la calidad de espermatozoides congelados-descongelados.....	102
6.2.1. Efecto de la incubación de los espermatozoides epididimarios en plasma seminal sobre la viabilidad espermática del semen refrigerado y congelado.....	102
6.2.2. Efecto de la incubación de los espermatozoides epididimarios en plasma seminal sobre el estado acrosomal y la viabilidad espermática del semen congelado-descongelado.....	105
6.2.3. Efecto de la incubación de los espermatozoides epididimarios en plasma seminal sobre la generación de ROS.....	109
6.2.4. Efecto de la incubación de los espermatozoides epididimarios en plasma seminal sobre la condensación de cromatina.....	111
6.3. Experiencia 3. Estudio de las características y composición del plasma seminal..	114
6.3.1. Capacidad antioxidantes total y concentración de proteínas totales del plasma seminal.....	114

6.3.2. Ácidos grasos presentes en el plasma seminal.....	115
6.3.3. Composición proteica del plasma seminal (electroforesis 1D).....	119
6.3.4. Electroforesis bidimensional diferencial (sistema 2D-DIGE).....	120
6.3.5. Identificación de proteínas.....	129
6.3.6. Identificación de proteínas en la totalidad del plasma seminal.....	143
7. DISCUSIÓN.....	148
8. CONCLUSIONES.....	176
9. CONCLUSSIONS.....	177
10. ABREVIATURAS.....	178
11. BIBLIOGRAFÍA.....	182

## 1. RESUMEN

A través de los años se han desarrollado diferentes técnicas para la obtención y criopreservación de semen. Si embargo, pocos estudios se han centrado en la crioconservación de espermatozoides de epidídimo sobre todo en la especie equina (Papa et al., 2008). La obtención y conservación de espermatozoides de epidídimo es de gran importancia para preservar material genético de animales valiosos o en peligro de extinción (Papa et al., 2008) ya que ésta es la última oportunidad que disponemos para conservar dicho germoplasma (Bruemmer, 2006). Por otro lado, tampoco se ha reparado en la determinación del tiempo máximo que los espermatozoides pueden permanecer viables en el epidídimo tras la castración o muerte del animal y si éstos espermatozoides conservados bajo tales circunstancias pueden ser crioconservados sin perder su poder fecundante (Godke et al., 2004).

El objetivo general de este trabajo fue estudiar la calidad de espermatozoides procedentes de epidídimo de caballo refrigerado (4°C) durante varios días (hasta 96 horas) antes y después de la crioconservación.

**En la primera experiencia** se estudió el efecto del tiempo de conservación del epidídimo, refrigerado a 4°C hasta 96 horas, sobre la cantidad y calidad de los espermatozoides antes y después de la congelación. Para ello analizamos el volumen, la concentración, la viabilidad y la condensación de la cromatina en espermatozoides procedentes de epidídimo conservados a 4°C durante 0, 24, 48, 72 y 96 horas. Además, se analizó la viabilidad y condensación de la cromatina de los espermatozoides a los 30 minutos de haber sido diluidos en el medio de congelación. Por último, de los espermatozoides congelados-descongelados se evaluó: la viabilidad, la condensación de la cromatina, la integridad acrosomal, los ROS, la fosforilación de tirosina bajo condiciones capacitantes y la formación de pronúcleos tras la fecundación in vitro (FIV) y tras la inyección intracitoplasmática (ICSI) en un sistema heterólogo con ovocitos bovinos.

Al valorar las muestras obtenidas en los diferentes tiempos en los que se conservaron los epidídimos observamos que el volumen medio ( $720 \pm 159 \mu\text{l}$ ) y la concentración espermática ( $6.5 \pm 0.4 \times 10^9$  espermatozoides/ml) no se vieron modificadas. La viabilidad espermática no mostró descenso hasta transcurrido 72 h de conservación, siendo superior al 80%. A las 96 horas en cambio, descendió al 77.2%. En relación a la condensación de la cromatina los resultados mostraron que los

espermatozoides no diluidos presentaban la cromatina descondensada y sin diferencias entre los grupos experimentales.

Por otro lado, cuando analizamos los espermatozoides epididimarios diluidos en el medio de congelación a 4°C durante 30 min, observamos que la viabilidad mantuvo valores similares durante las primeras 48 horas de conservación de epidídimo y que se redujo posteriormente (76'0% y 67'6% a las 72 y 96 horas respectivamente). La condensación de la cromatina mostró una hipercondensación durante el proceso de enfriamiento en el medio de congelación similar en todos los grupos experimentales analizados.

Por último, al analizar los espermatozoides descongelados, observamos que la viabilidad no se vio modificada por las horas de conservación aunque sí por el proceso de congelación-descongelación. En cuanto a la condensación de la cromatina, se observó un incremento de la misma, pero no influyó el tiempo de conservación. La integridad acrosomal, la viabilidad y la generación de ROS tampoco se vio afectada por el tiempo de conservación.

Además, se estudio la fosforilación de tirosina de proteínas de los espermatozoides descongelados tras ser incubados en un medio capacitante (enriquecido con calcio, albumina, bicarbonato y procaina). Observamos que en todos los tiempos de conservación estudiados se produjo fosforilación de tirosina pero no hubo diferencias entre ellos.

Finalmente, se determinó la capacidad fecundante de los espermatozoides descongelados evaluada mediante la activación del ovocito y la formación de pronúcleos. Los resultados mostraron que los espermatozoides procedentes de todos los grupos experimentales eran capaces de activar a los ovocitos y formar pronúcleos (masculino y femenino).

En términos generales, se puede concluir que se mantiene la calidad de los espermatozoides procedentes de epidídimo conservados a 4°C hasta 96 horas tras la descongelación.

En numerosos trabajos se ha demostrado el papel del plasma seminal sobre la calidad espermática en el proceso de criopreservación. A pesar de que existe una gran controversia al respecto, parece ser que bajo determinadas circunstancias el plasma seminal puede ser beneficioso para mantener la calidad espermática tras la descongelación. Por ello, nos planteamos realizar como **segunda experiencia** un estudio sobre la incubación de los espermatozoides de epidídimo durante 30 minutos en plasma seminal como fase previa a la criopreservación.

Los resultados obtenidos en cuanto a viabilidad posdescongelación fueron muy variables ya que ésta se incrementaba o disminuía dependiendo del macho del que procedía el plasma seminal. En cuanto a los parámetros condensación de la cromatina, integridad del acrosma y generación de ROS, no se vieron afectados ni por la incubación con el plasma seminal ni por el animal del que procedía dicho plasma.

Finalmente, como observamos que el plasma seminal de los diferentes machos presentaba efectos variables sobre la viabilidad espermática tras la crioconservación nos planteamos como **tercera experiencia** analizar los niveles de antioxidantes así como la concentración lipídica y proteica del plasma seminal de los machos utilizados.

En cuanto al nivel de antioxidantes los resultados mostraron que variaban en función del animal del que procediese el plasma seminal. Además éste plasma que tenía mayor concentración de antioxidantes, fue el que mejoró la viabilidad espermática tras la descongelación.

Los ácidos grasos analizados fueron saturados, monoinsaturados y polinsaturados (Omega-3 y Omega-6) y, al igual que ocurrió para el caso de los niveles de antioxidantes, también apareció gran variabilidad entre los plasma utilizados. El plasma seminal que tenía la mayor cantidad de ácidos grasos polinsaturados fue el que mejoró la viabilidad espermática tras la descongelación.

Por último se determinó la concentración de proteína presente en el plasma seminal. Observamos que también existía variabilidad en el plasma seminal de los tres animales. El plasma que presentó mayor cantidad de proteína fue el que más protegió a los espermatozoides durante el proceso de crioconservación en cuanto a viabilidad se refiere.

Además se analizó la composición proteica del plasma seminal de los tres machos y se identificaron aquellas proteínas que diferían entre ellos (dependiendo de su punto isoeléctrico y peso molecular).

Mediante la técnica de 2D-DIGE se hizo una comparación en paralelo entre el PS de los machos empleados. Fueron identificados 34 spots en total. En el primer gel se comparó el PS de Faraón y Alegre, en el segundo, se comparó el PS de Alegre y Ojeado y por último, en el tercero se comparó el PS de Faraón y Ojeado. En el gel "Faraón vs Alegre" se detectó un total de 28 manchas o spots de proteína de las cuales 15 spots corresponden a siete proteínas que tuvieron mayor relevancia (M01, M02, M03, M05, M06, M07, M09, M12, M13, M14, M16, M18, M21, M23 y M26). Sin

embargo, en el segundo gel "Alegre vs Ojeado" se detectó un total de cuatro spots, en el que encontramos dos proteínas relevantes pertenecientes a tres spots (M29, M30 y 31). En el tercer gel "Faraón vs Ojeado" se detectaron dos spots con una proteína relevante (M33).

## 2. Summary

Through the years different techniques have been developed for the extraction and cryopreservation of the semen. However, few studies have focused on the cryopreservation of epididymal spermatozoa, especially in the equine species (Papa et al., 2008). The sperm extraction and criopreservation from epididymides is of great importance to preserve genetic material from valuable or endangered animals (Papa et al., 2008) since this is the last opportunity that we have to preserve their germoplas (Bruemmer, 2006). On the other side, neither of them has been repaired in the determination of the maximum time that sperm can be alive in the epididymides after animal's castration or death and if the preserved spermatozoa under those conditions can be criopreserved without losing their fertilizing (Godke et al., 2004).

The main goal of this work was to study the effect of sperm storage, at 4°C up to 96 h, in the epididymides obtained from castrated horses and its effect on different functional sperm parameters.

Our first experiment were designed to study the effect of (1) sperm storage on viability and chromatin condensation; (2) pre-incubation of recovered epididymal sperm in the freezing extender, prior cryopreservation, on viability and chromatin condensation; (3) freezing–thawing on viability, chromatin condensation, ROS generation, protein tyrosine phosphorylation and heterologous fertilization rate (ICSI and IVF using bovine oocytes) of sperm recovered from the epididymis up to 96 h post castration. The average volume ( $720 \pm 159 \mu\text{l}$ ) and the concentration ( $6.5 \pm 0.4 \times 10^9$  spermatozoa/ml) of sperm recovered from the epididymis were not affected by storage. Sperm viability after refrigeration at 4°C for up to 72 h was similar. The effect of sperm dilution in the freezing media showed similar values up to 48 h, while viability was preserved up to 72 h. Cryopreserved spermatozoa show similar viability between different storage times. Chromatin condensation was not affected by storage time; however, incubation for 30 min in freezing medium and freezing–thawing process induced an increase in the chromatin decondensation. ROS generation was not affected by storage up to 96 h. Epididymal storage did not affect sperm protein tyrosine phosphorylation patterns; although the pattern of phosphorylation changed to strong staining of the equatorial segment when the sperm where capacitated in sperm–TALP. Finally, successful and similar pronuclear formation (analyzed by ICSI) and in vitro penetration (evaluated with bovine zone free oocyte) was observed using cryopreserved sperm obtained from prolong epididymal storage at 4°C. In conclusion, cryopreservation of epididymal

stallion sperm stored for up to 72 h in the epididymis at 4°C, maintain both viability and ability to fertilize in vitro.

Most of the studies have shown seminal plasma effect on the sperm quality during cryopreservation process. In spite of the existence of a large controversy, it seems that, in general terms and under certain circumstances, seminal plasma can be helpful to maintain the sperm quality after thawing. In the second experiment we studied the effect of sperm incubation with seminal plasma before cryopreservation on sperm viability, chromatin condensation, acrosomal integrity and ROS. Results showed that these parameters were not affected by sperm incubation with seminal plasma. However, we observed that viability was affected by male because it increased or decreased depending on plasma donor. The parameters chromatin condensation, acrosomal integrity and ROS generation, were not affected by either seminal plasma or by the animal.

The third experiment was designed to evaluate seminal plasma composition, particularly antioxidant level, lipid and protein concentration. Regarding the antioxidant level, the results shown that there were variability depending on the seminal plasma used. Moreover this plasma with the highest concentration of antioxidants improved the sperm viability after thawing.

In relation to fatty acids, different types were analysed (saturated, monounsaturated and polyunsaturated, among these Omega-3 and Omega-6). We observed variability between different plasma used. The seminal plasma which had the largest quantity of polyunsaturated fatty acids was the one which improved sperm viability after thawing.

At last, we determined protein concentration presented in seminal plasma from three animals. There was different protein concentration depending on the animal. We observed that seminal plasma with the largest amounts of protein was the best to protect the sperm viability.

In addition, protein composition from the seminal plasma was analyzed and also we identified which proteins were different between them (depending on their isoelectric point and their molecular weight).

Using the technique of 2D-DIGE a comparison in parallel was made between SP from each male and we identified 34 spots in total. We made three gels. The first gel was to compare protein from Faraón vs Alegre SP. In the second gel, Alegre vs Ojeado protein SP were compared and finally, in the third gel Faraón vs Ojeado protein SP was compared.

In the gel "Faraón vs Alegre" 28 spots were detected, which 15 spots of them corresponded to 7 proteins which had major importance (M01, M02, M03, M05, M06, M07, M09, M12, M13, M14, M16, M18, M21, M23 and M26). However, in the second gel "Alegre vs Ojeado", we detected a total of four spots, in which we found two relevant proteins belonging to three spots (M29, M30 and M31). And the end, in the third gel "Faraón vs Ojeado" two spots were detected with one relevant protein (M33).

### 3. INTRODUCCIÓN

La producción equina ha sido históricamente una actividad con gran importancia socio-económica a nivel mundial (Endenburg, 1999). Desde la domesticación del caballo entre los años 5000 y 3000 AC hasta la primera mitad del siglo XX, este animal ha servido como medio de transporte y como fuerza de tiro. Estas utilidades de los caballos fueron de vital importancia para el desarrollo de la agricultura, así como la base de la potencia militar y de los medios de comunicación de todos los pueblos.

Después de la segunda guerra mundial, la producción equina quedó relegada a las tareas agrícolas, pero la mecanización progresiva del agro supuso un cambio en el uso de estos animales. Entre ellos encontramos los fines recreativos y/o sociales, reproductivos, la producción de carne y las actividades deportivas (Endenburg, 1999).

En la actualidad la cría de caballos tiene un gran impacto económico en el mundo occidental como se ha puesto de manifiesto en diferentes estudios desarrollados en la Universidad de Pensilvania y la de West Virginia en Estados Unidos (Swinker et al., 2003; Hughes et al., 2005). Por otra parte, el Estudio y Caracterización del Sector Equino en España (Ministerio de Agricultura, 2003) pone de manifiesto que el sector equino en nuestro país, no sólo supone una importante base económica y de desarrollo en el medio rural, sino que además es un sector generador de puestos de trabajo.

La producción animal en general, y la equina en particular, está basada entre otras cuestiones, en la aplicación eficiente de las técnicas reproductivas (Squires, 2005). Aunque la especie equina fue considerada por mucho tiempo como la de menor fertilidad entre las especies domésticas (Bartolomé et al., 2008), la gestión reproductiva de las explotaciones y la aplicación de nuevas técnicas de reproducción asistida tiende a mejorar esta situación.

La criopreservación espermática se utiliza como herramienta para la mejora genética de las especies domésticas, en la conservación de especies y razas amenazadas o en peligro de extinción y es la base de los intercambios internacionales de germoplasma (Holt, 1997). En la especie equina la congelación de espermatozoides presenta una elevada variabilidad individual (Ball and Vo, 2001; Morris et al., 2002; Loomis and Graham, 2008). Esta realidad se considera como uno de los principales factores limitantes en el desarrollo de la tecnología de la congelación

en la industria equina (Loomis, 2001; Ortega-Ferrusola et al., 2009). Por otro lado, la técnica básica de congelación de espermatozoide en muchas especies animales no ha evolucionado sustancialmente desde el principio de los años 1950 (Woods et al., 2004; Miller, 2008). Otra cuestión importante a tomar en consideración es que hasta hace pocos años no se ha aceptado el empleo de semen congelado por la mayoría de los principales criadores de caballos y eso supuso un serio limitante para el desarrollo de la técnica. La nueva situación ha dado un impulso considerable para la investigación y mejora en el uso del semen congelado (Loomis, 2001; Squires, 2005; Aurich and Aurich, 2006).

Por otra parte, debido al creciente interés y preocupación por preservar la biodiversidad animal, que desciende a un ritmo considerable en todo el mundo, se ha extendido el interés por conservar germoplasma a los animales salvajes, mediante la creación de bancos genéticos (Smits et al., 2012). La creación y mantenimiento de los bancos de germoplasma tienen como objetivo la conservación ex situ de los animales valiosos, que deberá ser aplicada en combinación con programas de conservación in situ de razas y especies amenazadas. En este sentido y debido a la gran similitud reproductiva entre los diferentes miembros del género *Equus*, el caballo doméstico se puede utilizar como modelo para optimizar los protocolos de biotecnología reproductiva con el fin de aplicarlos a otros equinos salvajes (Smits et al., 2012).

Por las características propias de la producción y los usos deportivos, en la especie equina la muerte súbita de un animal se produce con mayor frecuencia que en el resto de especies domésticas. Por una parte, la presentación de cuadros traumáticos son la principal causa de la morbilidad y mortalidad de los caballos (Owen et al., 2012), por otra parte los cuadros de dolor cólico son de especial relevancia en estos animales y pueden llevar a la muerte o al sacrificio de animales de alto valor genético. Del mismo modo, los animales destinados a actividades deportivas o recreativas son sometidos a castración con lo que se pierde la capacidad reproductiva de los mismos y ello conlleva a la pérdida de material genético de animales de alto valor (Aurich and Aurich, 2006).

Por tanto, una lesión grave, enfermedades, cólicos o cualquier circunstancia que lleva a la muerte repentina de un animal, puede acabar con la vida reproductiva tanto de équidos domésticos como de los salvajes (Cary et al., 2004). Bajo estas circunstancias la única opción de recuperar espermatozoides viables sería a partir de los epidídimos del animal fallecido, y probablemente esta sea la última oportunidad de la que se dispone para salvar un material de alto valor genético (Cary et al., 2004; Bruemmer, 2006).

Por otra parte, también es posible obtener muestras espermáticas de animales enfermos o en situación terminal por inducción de la eyaculación mediante una estimulación eléctrica (electroeyaculación) (Cary et al., 2004) o con el uso de fármacos como xilazina, imipramina y prostaglandinas (Turner et al., 1995; Card et al., 1997; Monteiro et al., 2009). El interés en utilizar espermatozoides epididimarios de los équidos de la especie doméstica y la salvaje aumenta cada vez más debido al valor inherente de muchos individuos que mueren antes de hacer una contribución genética a su propia población animal (Godke et al., 2003).

La obtención de espermatozoides epididimarios ha sido desarrollada con éxito en diferentes especies, incluyendo el caballo (Barker and Gandier, 1957; Sharma et al., 1997; Blash et al., 2000; Monteiro et al., 2009). Al igual que en otras especies, los epidídimos de caballo almacenan un gran número de espermatozoides morfológicamente normales y viables, por tanto, representan una potencial fuente de germoplasma (Bruemmer, 2006; Papa et al., 2008; Monteiro et al., 2011). Sin embargo, en terminos generales, el rendimiento tanto del proceso de congelación espermática como de la fertilidad derivada del uso de muestras epididimarias aún se encuentra por debajo del obtenido con el semen eyaculado (Morris et al., 2002), aunque en algunos estudios no se haya apreciado diferencias entre el uso de semen eyaculado y muestras espermáticas del epididimo (Monteiro et al., 2011).

Los espermatozoides de los mamíferos pueden sobrevivir por un tiempo en los epidídimos de animales muertos, aunque la calidad de estos espermatozoides se deteriora rápidamente como consecuencia de los procesos de descomposición del cadáver. De modo que las alteraciones de la calidad de los espermatozoides epididimarios se incrementa de manera proporcional al tiempo que transcurre tras la muerte (Songsasen et al., 1998). En lo que a la especie equina se refiere, el momento de recogida puede variar en gran medida, según dónde, cuándo y cómo se produzca la muerte del animal o donde se ejecute la castración. Por tanto, la calidad de los espermatozoides epididimarios puede verse afectada por el tiempo que transcurra entre la muerte del animal o castración y la recogida de los mismos (Kaabi et al., 1999; Monteiro et al., 2011).

En muchos casos es necesario el transporte de los epidídimos desde el lugar donde se produce la castración o muerte del animal hasta un centro que tenga la capacidad y experiencia para obtener y preservar de forma adecuada los espermatozoides epididimarios. La conservación del tracto genital (incluyendo a los epidídimos) a baja temperatura podría mejorar la recuperación y posterior procesado espermático en el laboratorio (Bruemmer et al., 2002; James et al., 2002). En este

sentido, Monteiro et al. demostraron que espermatozoides de caballo obtenidos de la cola del epidídimo, inmediatamente después de la castración o después de la conservación de los epidídimos a 4°C durante 24 horas tienen la capacidad de fecundar de manera similar a los espermatozoides eyaculados (Monteiro et al., 2011).

Otra cuestión fundamental es la capacidad de congelación que presentan los espermatozoides epididimarios de caballo. Los primeros estudios en este campo, permitieron en 1957 obtener la primera gestación en una yegua mediante inseminación artificial con espermatozoides epididimarios congelados-descongelados (Barker and Gandier, 1957). Posteriormente diversos estudios han analizado los factores que pueden afectar a la capacidad de congelación de los espermatozoides de epidídimo (Barker and Gandier, 1957; Jimenez, 1987; Braun et al., 1994; James et al., 2002; Bruemmer, 2006; Papa et al., 2008; Heise et al., 2010). Sin embargo, hasta la fecha son muy pocos los estudios que han analizado la fertilidad y capacidad de fecundación resultante de la aplicación mediante inseminación artificial de los espermatozoides de epidídimo congelados-descongelados (Barker and Gandier, 1957; Morris et al., 2002; Melo et al.; Heise et al., 2010).

Como anteriormente se ha comentado, existe una gran variabilidad entre sementales en la capacidad de congelación de los espermatozoides (Vidament et al., 1997; Loomis, 2001; Loomis and Graham, 2008). Aunque la capacidad de congelación podría ser una cuestión influenciada por multitud de factores (Blottner et al., 2001). Algunos autores sugieren que parte de esta variabilidad es atribuible a la composición del plasma seminal (Aurich et al., 1996; Pesch et al., 2006). De hecho una fase muy importante dentro del procesado espermático para congelar es el centrifugado de la muestra seminal para la eliminación del plasma seminal (Brinsko et al., 2000). No obstante, también se ha determinado que la presencia de ciertos componentes del plasma mejoran la calidad espermática durante el proceso de la criopreservación (Aurich et al., 1996).

La congelación de espermatozoides epididimarios es un excelente modelo para analizar el efecto de la adición de plasma seminal o alguno de sus componentes sobre la calidad espermática postdescongelación. La presencia del plasma seminal durante la congelación de espermatozoides epididimario de caballo aún sigue siendo tema de controversia por la divergencia que existe entre los protocolos utilizados por los investigadores y por ello en los resultados obtenidos. Así, algunos autores han sugerido la posibilidad de mejorar los resultados de la calidad espermática y la fertilidad de los espermatozoides congelados mediante la adición de plasma seminal

antes de la congelación(Heise et al., 2010), mientras que otros estudios no detectan una mejora significativa (Morris et al., 2002).

Diversos autores han estudiado la composición proteica del plasma seminal equino (Amann et al., 1987; Frazer and Bucci, 1996b; McDowell et al., 1996) y la posible relación de la fertilidad con la presencia de determinadas proteínas (Frazer and Bucci, 1996b; a; Brandon et al., 1999; Novak et al., 2010). Estos estudios han puesto de manifiesto la variabilidad que se presenta entre los diferentes animales. Basados en esta variabilidad individual, se podría esperar por tanto que la adición de plasma seminal procedentes de diferentes sementales produjese un resultado diferente, lo que permitiría buscar qué componente del plasma seminal es el causante de ese comportamiento diferencial, como previamente se ha estudiado en otras especies como el porcino (Hernandez et al., 2007).

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

La hipótesis que nos planteamos en este trabajo fue que los espermatozoides de epidídimo conservados a 4°C durante un periodo de tiempo dentro del epidídimo, podían ser recogidos y criopreservados sin perder su funcionalidad. Por otra parte, el siguiente planteamiento fue pensar la posibilidad de que la adición de plasma seminal procedente de diferentes sementales a estos espermatozoides epididimarios podría mejorar la calidad tras la congelación y finalmente que el análisis diferencial de los componentes presentes en el plasma seminal podría ofrecer una base para comprender la función que ejercen.

Con el propósito de desarrollar esta hipótesis planteamos los siguientes objetivos:

1. Evaluar el efecto de la conservación de los epidídimos de caballo hasta 96 h a 4°C sobre la calidad espermática antes y después de la criopreservación.
2. Estudiar el efecto de incubación de los espermatozoides de epidídimo con plasma seminal sobre la calidad de espermatozoides frescos y congelados-descongelados.
3. Estudiar diferencias en la composición del plasma seminal en cuanto a proteínas, capacidad antioxidante y ácidos grasos, de animales con distinto rendimiento en la criopreservación espermática.

#### 4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En el presente capítulo se plantea efectuar una revisión de las características principales que presentan los espermatozoides de epidídimo de caballo, las modificaciones que sufren durante el tránsito por las diversas porciones del epidídimo, así como la metodología que se emplea para la obtención y congelación de los espermatozoides de la porción caudal del epidídimo y las técnicas analíticas que se usan para su evaluación.

Igualmente revisaremos los aspectos más importantes de la composición del plasma seminal equino y la importancia que estos factores pueden tener en la funcionalidad espermática y en la fertilidad.

##### 4.1. El espermatozoide equino

El espermatozoide es una célula altamente especializada para llevar a cabo su función en la formación de un cigoto al fusionar su núcleo con el del gameto femenino. Estructuralmente podemos diferenciar diversas partes en el espermatozoide: la cabeza que incluye el núcleo, la pieza intermedia, la pieza principal y la pieza final (Figura 1A) (Brito, 2007; Meyers, 2009).

El espermatozoide de caballo posee una longitud total de unos 50-60  $\mu\text{m}$  (Pesch and Bergmann, 2006; Brito, 2007; Meyers, 2009). La cabeza espermática es aplanada, con una longitud entre 5 a 7  $\mu\text{m}$  y un ancho aproximado de 2'5 a 3  $\mu\text{m}$  (Gravance et al., 1996; Casey et al., 1997; Hidalgo et al., 2005) (Figura 4.1B). La máxima anchura de la cabeza espermática se presenta en el segmento ecuatorial. El acrosoma deriva del complejo de Golgi y en su composición se encuentran numerosas enzimas hidrolíticas y glucolíticas que son importantes para la fecundación. Aunque no han sido específicamente descritas en el caballo, las enzimas más estudiadas son la proacrosina-acrosina, hialuronidasa,  $\beta$ -galactosidasa, varias proteasas, neuroaminidasas, esterases, arilsulfatasas y fosfolipasas A y C, numerosas fosfatasa y enzimas reguladoras (Ball et al., 1997; Meyers, 2009). La cabeza fundamentalmente está compuesta del material nuclear que contiene un número haploide de cromosomas, 32 en esta especie.

El borde posterior de la cabeza del espermatozoide y la pieza intermedia se unen en la región del **cuello** (Figura 4.1A)(Brito, 2007). Esta zona contiene varias estructuras especializadas como son las columnas segmentadas y el cóndilo (Figura

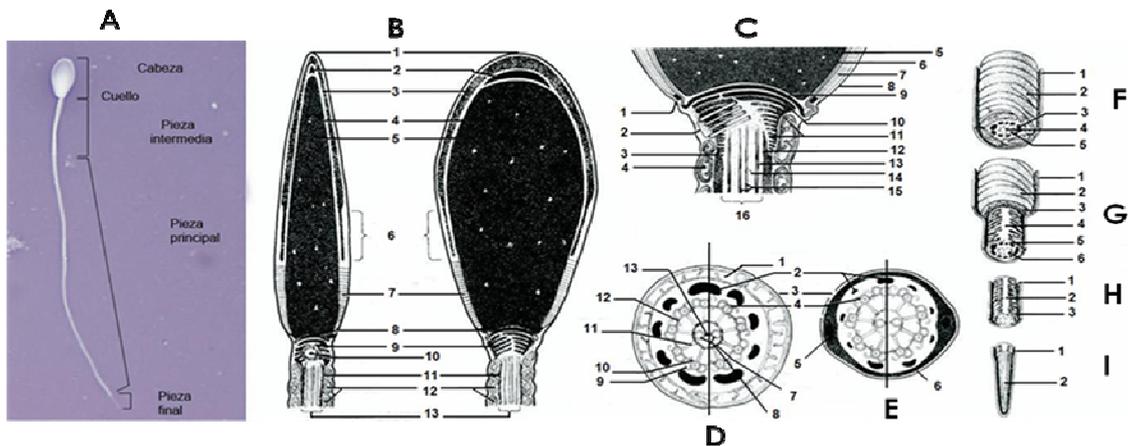
4.1B y C). El cóndilo forma el borde craneal del flagelo en la fosa de implantación y se compone de proteínas ricas en puentes disulfuro (Pesch and Bergmann, 2006).

La **pieza intermedia** es un segmento de la cola que se caracteriza por la presencia de mitocondrias que rodean a las fibras densas externas en la parte media, que tiene una longitud que oscila entre 8 a 10'5  $\mu\text{m}$  (Figura 4.1B, C, D, E, F, G) y se extiende desde el extremo caudal del cuello hasta el anillo (Pesch and Bergmann, 2006). El anillo es una estructura densa a la que se adhiere el plasmalema y previene el desplazamiento caudal de la cubierta mitocondrial. También a nivel del anillo terminan dos de las nueve fibras densas, las siete restantes continúan hacia la pieza principal (Escalier, 1984; Olson and Winfrey, 1992).

La **pieza principal** es el segmento más largo de la cola (Figura 4.1D, E, G, H), mide de 30 a 44  $\mu\text{m}$  y se extiende desde el anillo hasta la pieza final (Pesch and Bergmann, 2006). El axonema está rodeado por las fibras densas externas, que se continúan con las de la pieza intermedia y quedan rodeadas, a su vez, por la vaina fibrosa (Escalier, 1984; Olson and Winfrey, 1992). El axonema es el que da la motilidad al espermatozoide (Meyers, 2009).

La **pieza terminal** del flagelo mide de 4 a 5  $\mu\text{m}$  y contiene sólo el axonema central cubierto por la membrana plasmática (Figura 411).

**Figura. 4.1.** Representación esquemática de un espermatozoide de caballo (tomado y modificado de (Brito, 2007). **A) Partes del espermatozoide;** cabeza, cuello, pieza intermedia, pieza principal y pieza final. **B) Cabeza y pieza intermedia proximal,** 1. Membrana plasmática, 2. Perforatorium, 3. Acrosoma, 4. Envoltura nuclear, 5. Núcleo, 6. Segmento ecuatorial, 7. Lamina post-acrosomal, 8. Capitel, 9. Columna segmentada, 10. Centriolo, 11. Fibras densas, 12. Mitocondria, 13. Axonema. **C) Otros componentes de la cabeza y pieza intermedia proximal** 1. Anillo posterior, 2. Centriolo proximal, 3. Fibras densas, 4. Mitocondria, 5. Núcleo, 6. Envoltura nuclear, 7. Lamina post-acrosomal, 8. Membrana plasmática, 9. Placa basal, 10. Capitel, 11. Columna segmentada, 12. Fibras densas, 13. Dobletes, 14. Espinas radiales, 15. Par central, 16. Axonema. **D y E) Corte transversal de la pieza intermedia y pieza principal** 1. Mitocondria, 2. Fibras densas, 3. Membrana plasmática, 4. Doblete, 5. Columna segmentada, 6. Costilla fibrosa, 7. Vaina central, 8. Par central de los túbulos 9. Brazo exterior de dineína, 10. Brazo interior de dineína, 11. Espinas radiales, 12. Puente de nexina 13. Puente cruzado. **F) Segmento distal de la pieza intermedia,** 1. Membrana plasmática, 2. Mitocondria, fibras densas, 4. Par central, 5. Doblete. **G) Pieza intermedia y pieza principal,** 1. Membrana plasmática, 2. Mitocondria, 3. Anillos, 4. Columna longitudinal, 5. Fibras densas, 6. Doblete. **H) Porción final de la pieza principal,** 1. Membrana plasmática, 2. Columna longitudinal, 3. Vaina fibrosa. **I) Pieza final,** 1. Membrana plasmática, 2. Doblete

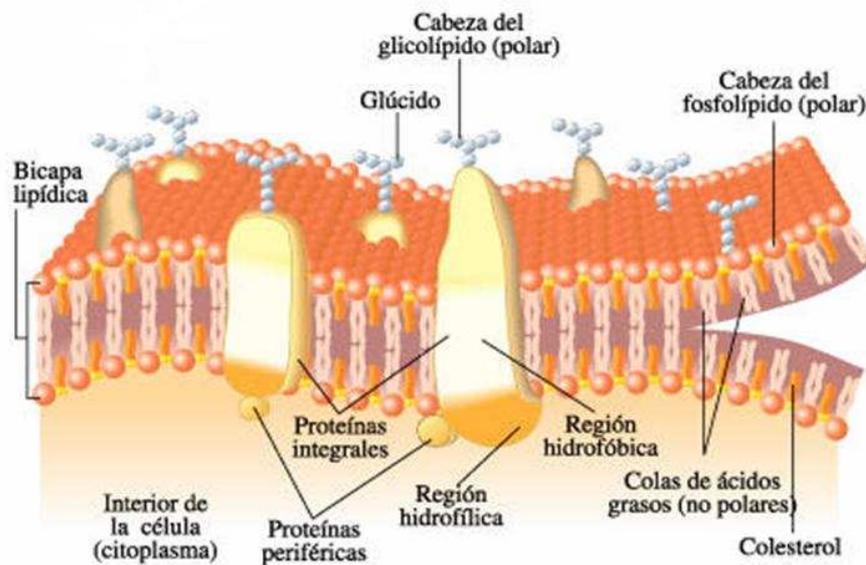


#### 4.2. Composición de la membrana del espermatozoide

Las propiedades biológicas y biofísicas de las membranas celulares vienen determinadas por su composición molecular. Así, la composición de la membrana de los espermatozoides es de especial interés por su papel en la fecundación, así como por los cambios físicos que sufre durante la refrigeración y la criopreservación y que determinan su viabilidad (Parks and Lynch, 1992).

La membrana plasmática del espermatozoide es heterogénea y tiene cinco dominios específicos: el acrosoma, el segmento ecuatorial y basal, la pieza intermedia y la cola (Ladha, 1998). Las diferencias en la composición de la membrana en estas regiones están relacionadas con sus funciones fisiológicas.

**Figura 4.2.** Modelo de la membrana plasmática de una célula animal, (tomada y modificada de [iescarin.educa.aragon.es](http://iescarin.educa.aragon.es))



En la mayoría de mamíferos, los espermatozoides son completamente maduros cuando llegan al final de la cola del epidídimo (Flesch and Gadella, 2000). Durante el tránsito del espermatozoide a través del epidídimo su membrana plasmática sufre cambios como consecuencia de la liberación, adsorción y modificación de proteínas y lípidos (Sostaric et al., 2008). Algunas de las proteínas adsorbidas durante la

maduración epididimaria están involucradas en la interacción espermatozoide-ovocito, entre otras encontramos las proteínas PH-20, P26h, CRISP-1, CRISP-2 o la espermadhesina (Flesch and Gadella, 2000; Sostaric et al., 2008). Además la membrana plasmática del espermatozoide se somete a varios cambios y entre ellos destacan la integración de los lípidos y la modificación del grado de saturación de los ácidos grasos (Gadella et al., 2001) y se produce una pérdida de colesterol que conlleva a una disminución pronunciada en la relación colesterol/fosfolípidos (Gadella et al., 2001).

#### **4.2.1. Composición lipídica**

Los lípidos constituyen aproximadamente el 50 % de la masa de la mayoría de las membranas celulares, con la presencia de aproximadamente 5 millones de moléculas de lípidos por  $\mu\text{m}^2$  de la bicapa lipídica.

Todas las moléculas lipídicas de las membranas celulares son anfipáticas o anfifílicas, es decir, tienen un extremo hidrofílico "polar" y el otro hidrófobo "no polar" (Alberts B, 1994). Se ha estudiado la composición lipídica de la membrana plasmática de los espermatozoides de varias especies de mamíferos y se ha comprobado que existe una variación considerable entre distintas especies de mamíferos (Tapia et al., 2012), y en caballo se ha relacionado la composición lipídica con la calidad seminal del semen fresco y congelado (Macías García et al., 2011).

En terminos generales podemos considerar que la membrana plasmática contiene aproximadamente un 70% de fosfolípidos, 25% de lípidos neutros y un 5% de glicolípidos (Flesch and Gadella, 2000).

##### **4.2.1.1. Fosfolípidos**

Los fosfolípidos son componentes integrales de la membrana espermática, aunque también están implicados en la permeabilidad celular, en las actividades enzimáticas, pueden actuar como segundos mensajeros en las transmisiones de señales al interior de la célula y tienen un papel importante en el aporte energético durante la proliferación y la maduración de los espermatozoides. Además se sugiere que la relación colesterol-fosfolípidos juega un papel importante en la capacidad fecundante de los espermatozoide (Sebastian et al., 1987; Brinsko et al., 2007).

Como en el resto de células, los fosfolípidos constituyen la mayor parte de la bicapa lipídica, y en la especie equina los fosfolípidos representan el 57-58% de los lípidos de la membrana del espermatozoide (Komarek et al., 1965; Gadella et al., 2001). La principal diferencia en la composición de los fosfolípidos de las membranas biológicas está asociada a los ácidos grasos de que los componen y, más importante aún, por el grado de saturación de los mismos (Tapia et al., 2012).

Los fosfoglicéridos o glicerofosfolípidos son la fracción de los fosfolípidos más representativa de la membrana espermática y, entre ellos, la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina son los predominantes, sin que haya diferencias significativas entre especies (Parks and Lynch, 1992). Así por ejemplo, el espermatozoide humano presenta un 50% de fosfatidilcolina, 30% de fosfatidiletanolamina, 12'5% de esfingomielina, 3% de fosfatidilserina, 2'5% cardiolipina o difosfatidilglicerol y un 2% de fosfatidilinositol (Lutwak-Mann, 1981). Mientras que el espermatozoide de caballo tiene un 48% de la fosfatidilcolina, 16% de la fosfatidiletanolamina, 13% de esfingomielina, 15% de fosfatidilserina y cardiolipina, 5% de fosfatidil glicerol y 3% de fosfatidilinositol (Gadella et al., 2001).

#### **4.2.1.2 Colesterol**

El **colesterol** es el principal regulador de la fluidez de la membrana plasmática, ya que aumenta la flexibilidad y la estabilidad mecánica de la bicapa. Es una molécula anfipática por lo que presenta una orientación similar a la de los fosfolípidos. El grupo hidroxilo del colesterol se encuentra entre las cabezas del fosfolípidos (hacia el exterior), mientras que la cadena hidrocarbonada se coloca entre las cadenas apolares (entre las colas de los ácidos grasos "hacia el interior"). Su principal función es proporcionar estabilidad a la estructura de ácidos grasos en un amplio rango de temperatura bloqueando los grandes movimientos de los ácidos grasos. A bajas temperaturas previene la compactación de las cadenas carbonadas de los ácidos grasos ya que impiden que las colas se junten (Darin-Bennett and White, 1977).

#### **4.2.1.3. Lípidos neutros**

Son ésteres de ácidos grasos con alcoholes, y no tienen ningún otro tipo de componentes, por lo que son moléculas muy poco reactivas. Existe una gran variación

en la composición de lípidos neutros de la membrana espermática entre especies, individuos de la misma especie e incluso entre eyaculados del mismo animal, siendo el factor más variable la cantidad de colesterol. El 73% de lípidos neutros en caballo lo componen el ácido mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) y oleico (C18:1 n-9) (Macías García et al., 2011).

#### **4.2.1.4. Balsas lipídicas**

Las balsas lipídicas son complejos formados por lípidos (colesterol y glicoesfingolípidos) y proteínas que se encuentran asociados a la membrana plasmática formando microdominios (Travis et al., 2001; Nixon and Aitken, 2009) y que se caracterizan por ser insolubles en detergentes no iónicos a bajas concentraciones. Estas balsas lipídicas pueden detectarse por la presencia de varios marcadores, entre los que encontramos la caveolina-1 (CAV1) que tiene alta afinidad por colesterol.

Las balsas lipídicas están presentes en toda la superficie de los espermatozoides de mamíferos formando estructuras con funciones específicas (Honda et al., 2002). Entre los papeles más importantes de las balsas lipídicas en la superficie celular se encuentra su función en la transducción de señales hacia el interior de la célula promoviendo el incremento de segundos mensajeros como el inositol fosfato (Simons and Toomre, 2000) y también interviene en la regulación de la motilidad espermática (Travis et al., 2001).

La localización de las balsas lipídicas en los espermatozoides varía entre las diferentes especies. En el ratón y el cobaya se encuentran CAV1 en la porción anterior del acrosoma y la pieza principal de los espermatozoides (Travis et al., 2001), mientras que en espermatozoides de la especie equina se encuentra en el acrosoma y en el segmento ecuatorial (Gamboa and Ramalho-Santos, 2005).

#### **4.2.1.5. Glicolípidos**

Los glicolípidos son compuestos que contienen estructuras tanto de lípidos como de carbohidratos y se caracterizan por ser solubles en disolventes orgánicos no polares. Las células germinales masculinas contienen un glicolípidos específico en su membrana denominado seminolípidos o sulfogalactosilglicerolípidos (SGG) (Flesch and Gadella, 2000; Gadella et al., 2001). Después de la eyaculación estos seminolípidos

pueden ser desulfatados por la acción de la arilsulfatasa que se origina en las glándulas accesorias (Gadella et al., 1993).

Los glicolípidos presentes en la membrana plasmática del espermatozoide pueden tener un papel importante en la organización de dominio lateral (Nikolopoulou et al., 1985; Parks et al., 1987; Wolf et al., 1988). Los SGG se encuentran distribuidos tanto en la membrana de la cabeza como de la cola de los espermatozoides (Murry et al., 1980) y parece estar relacionados con el proceso de la capacitación espermática y con la interacción a la zona pelúcida (Furimsky et al., 2005).

#### **4.2.2. Composición proteica**

Aunque los lípidos forman la estructura básica de las membranas celulares y participen en muchas de sus actividades, la mayoría de las funciones específicas son realizadas por proteínas integradas dentro de la bicapa lipídica (Dormeyer et al., 2008).

El 50% de la masa de la membrana celular está formada por proteínas de diferentes tipos que se clasifican como proteínas integrales y periféricas (Alberts B, 1994). Las proteínas integrales forman parte de la estructura de la membrana y presentan un dominio extracelular y otro transmembrana. Por otro lado, las proteínas integrales de la membrana atraviesan la bicapa lipídica y son anfipáticas, sus regiones hidrofóbicas son responsables de la incorporación de las proteínas en la bicapa lipídica, mientras que las regiones hidrofílicas sobresalen hacia el citoplasma o al medio extracelular para interactuar con moléculas de proteínas solubles (Dormeyer et al., 2008). Las proteínas periféricas se encuentran unidas a las proteínas integrales y/o a los lípidos de la membrana a través de las interacciones electrostáticas, es decir, por uniones no covalentes.

La mayoría de las proteínas que se producen en el tejido testicular se reabsorben en la rete testis o en la primera región del epidídimo y posteriormente nuevas proteínas son secretadas en otras regiones del epidídimo (Voglmayr et al., 1980; Voglmayr et al., 1983; Gatti et al., 2000). Por lo tanto, los cambios en la membrana plasmática de los espermatozoides epididimarios están íntimamente relacionados con la actividad secretora del epitelio del epididimario (Gatti et al., 2000). Además, el epitelio del epididimo produce de forma activa tanto pequeñas moléculas (azúcares libres y electrolitos) como macromoléculas (proteínas y

glicoproteínas) que proporcionan un entorno adecuado para la maduración de los espermatozoides (Jones, 1998b) involucrando cambios morfológicos y bioquímicos que incluyen la modificación de las glicoproteínas de la superficie espermática (Tulsiani, 2003).

Las proteínas secretadas por el epitelio epididimario se pueden integrar a la membrana espermática mediante dos mecanismos. El primer mecanismo es mediante la unión de proteínas a moléculas fosfatidilinositol que están anclados en la membrana por ejemplo (CD52 y CD59) (Schröter et al., 1999). El otro mecanismo puede ser por el efecto proteolítico que permite la inclusión de partes de estas proteínas secretadas en la membrana celular y la redistribución de otras proteínas en diferentes dominios celulares (Cooper, 1998; Jones, 1998b; Gatti et al., 2000).

Otra hipótesis que ha sido sugerida se debe al hallazgo reciente de los proteasomas como vesícula presentes en el epidídimo y en el fluido epididimario (Ronquist and Brody, 1985; Aumüller et al., 1997). Estas vesículas transfieren proteínas del epitelio a la membrana plasmática del espermatozoide (Légaré et al., 1999; Schröter et al., 1999).

#### **4.2.2.1 Glicoproteínas**

Las glicoproteínas son macromoléculas estructuralmente complejas integradas en la membrana que están compuestas por una proteína unida a uno o varios hidratos de carbono. Los azúcares más frecuentes detectados en las glicoproteínas espermáticas son la galactosa, , manosa, fucosa y glucosa (Iusem et al., 1989).

Las glicoproteínas intervienen en múltiples funciones espermáticas. Participan en la interacción de los espermatozoide con las células del tracto genital femenino (DeMott et al., 1995; Lefebvre et al., 1997; Suarez et al., 1998; Revah et al., 2000) y en el proceso de reconocimiento entre espermatozoides y ovocitos (Benoff, 1997; Tulsiani et al., 1997).

La superficie de los espermatozoides de mamíferos está cubierta por una capa densa de moléculas ricas en carbohidratos formando un glicocalix de 20-60 nm de espesor. La mayoría de los residuos glucídicos se unen a las proteínas integrales de la membrana espermática formando una capa extracelular en su superficie (Schröter et al., 1999; Flesch and Gadella, 2000).

Se estima que puede haber varios cientos de glicoproteínas diferentes que integran el glicocalix. Estas glicoproteínas son sintetizadas tanto en los testículos como en el epitelio de los conductos eferentes, en el epidídimo y en las glándulas accesorias.

#### **4.2.2.2. Glicocalix**

En cuanto a la presencia de estas proteínas en el fluido epididimario se refiere, diversas proteínas se encuentran en altas concentraciones en el fluido epididimario modificando la estructura del espermatozoide durante la etapa de la maduración (Tulsiani, 2003). Entre ellas la glicoproteína ( $^3\text{[H]}$  Gal-fetuin), glicoproteína CE9 (Tulsiani et al., 1998), glicoproteína epididimal ácida (Roberts et al., 2001), las glicohidrolasas (proteasas, nucleasas, lipasas, fosfolipasas y sulfatasas), las glicotrasferasas fucosiltransferasa, glucosaminiltransferasa, galactosiltransferasa y sialiltransferasa y  $\alpha$ -1B-glicoproteína de 67'7 kDa inhibidor de la metaloproteasa (Fouchecourt et al., 2000).

Probablemente parte de las proteínas antes descritas se unen a los espermatozoides después de su liberación del testículo, durante el tránsito y almacenamiento en el epidídimo (Schröter et al., 1999; Fouchecourt et al., 2000). La adquisición de glicocalix está relacionada con la capacidad fecundante del espermatozoide (Schröter et al., 1999). También se piensa que el glicocalix puede estar relacionado con la maduración de la membrana plasmática, con la inmunoprotección en el tracto genital femenino, con la interacción del espermatozoide con la zona pelúcida y finalmente con la fecundación (Schröter et al., 1999).

Entre los componentes del glicocalix de la región de la cabeza espermática en el caballo aparece galactosa, manosa, N-acetilglucosamina y fucosa (Desantis et al., 2010).

#### **4.3. Movilidad y fluidez de la membrana plasmática**

Como hemos mencionado anteriormente, la membrana plasmática está formada por una bicapa lipídica (fosfolípidos, glucolípidos y colesterol) y proteínas (integrales y periféricas). La fluidez de la membrana es un parámetro complejo que está influenciada por las variables biofísicas temperatura, pH y carga eléctrica y por las variables bioquímicas que caracterizan a los lípidos (Ladha, 1998).

El grado de fluidez puede modular diversas funciones de la membrana como la transducción de señales, el transporte de iones o el tráfico de vesículas, que permite transportar moléculas solubles disueltas en medio acuoso, así como el transporte de lípidos y proteínas que tienen función de canales o receptores (Bookstein et al., 1997; Srivastava and Dash, 2001; Brown et al., 2003; Sengupta et al., 2007).

Se sabe que la composición de lípidos de la membrana plasmática tiene un efecto significativo sobre las características funcionales del espermatozoide (Poulos et al., 1973; Zalata et al., 1998; Conquer et al., 1999; Lenzi et al., 2000; Gulaya et al., 2001; Leßig et al., 2004; Soler et al., 2005; Aksoy et al., 2006; Tavilani et al., 2008). En espermatozoide de la especie humana se han detectado altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) (Ahluwalia and Holman, 1969; Poulos et al., 1973). La proporción de estos ácidos grasos insaturados en relación con los ácidos grasos saturados y el colesterol están estrechamente correlacionados con la fluidez de la membrana del espermatozoide (Lenzi et al., 1996).

La modificación del contenido de colesterol de espermatozoide durante la maduración epididimaria supone una disminución en un 50% aproximadamente en oveja (Parks and Hammerstedt, 1985), rata (Aveldano et al., 1992), hámster (Awano et al., 1993), ratón (Rejraji et al., 2006) y en caballo (Glazar et al., 2009). Sin embargo, en cabra el contenido de colesterol aumenta durante la maduración epididimaria (Rana et al., 1991).

Esta pérdida de colesterol se suele acompañar de una disminución de colesterol/fosfolípidos que es un indicador de la fluidez de la membrana, incrementando así la proporción de los ácidos grasos poli-insaturados en las especies bovina (Poulos et al., 1973); porcina (Nikolopoulou et al., 1985); ovina (Poulos et al., 1975; Hammerstedt et al., 1979; Parks and Hammerstedt, 1985); caprina (Rana et al., 1991); rata (Aveldano et al., 1992), lo que indica que la fluidez de la membrana de los espermatozoides aumenta una vez que sale del epidídimo. En humano, se demostró la mayor fluidez de la membrana en los espermatozoides de la cola de epidídimo en relación a los espermatozoides de la cabeza de epidídimo mediante la técnica de anisotropía (Bleau and VandenHeuvel, 1974). Por otro lado, el contenido de esteroides celulares parece estar relacionado con la duración de la capacitación (Yanagimachi, 1994).

La fluidez de la membrana se puede medir mediante la técnica de recuperación de fluorescencia después de fotodecoloración (FRAP). Ésta técnica determina la velocidad y el desplazamiento lateral a la que se mueven las moléculas

lipídicas o proteicas de la membrana. También se puede medir por la técnica de anisotropía de fluorescencia que mide el movimiento rotatorio de los lípidos en la membrana (Stubbs and Smith, 1984). Aunque cada método determina un aspecto diferente de la organización de la membrana, el objetivo de ambas técnicas es determinar la fluidez de la membrana (Stubbs and Smith, 1984).

A temperatura fisiológica la membrana plasmática tiene una consistencia líquida y altamente ordenada. Una vez que aumenta la temperatura se incrementa la movilidad molecular y la membrana sufre una transición a un estado más fluido y desordenado, incrementando la fluidez de la membrana, pero cuando la temperatura desciende por debajo de la temperatura corporal, los lípidos experimentan transiciones de fase de un estado líquido a un estado gelificado haciendo la membrana menos fluida y más rígida (Holt, 2000; Blesbois et al., 2005). La temperatura a la que se produce esta transición depende de cada tipo de lípido. En general, las membranas espermáticas sufren daños en su estructura durante el proceso de congelación y descongelación, debido a la pérdida de la fluidez de sus componentes lipídicos (James et al., 1999; Neild et al., 2003).

#### **4.4. Núcleo espermático. Cromatina**

La cromatina del espermatozoide es una estructura sumamente organizada y compacta formada por ADN y nucleoproteínas (las histonas y las protaminas). Las nucleoproteínas desempeñan una función estructural mediante la compactación del ADN (D'Occhio et al., 2007; Adam and Polo, 2012).

En las últimas etapas de la espermatogénesis las histonas son substituidas por proteínas de transición y posteriormente por protaminas en el núcleo del espermatozoide (Oliva, 2006; Kasinsky et al., 2011). Estas protaminas son las responsables de la condensación final y estabilización de la cromatina espermática (D'Occhio et al., 2007).

En la compactación de la cromatina se han descrito dos etapas distintas en las que están implicadas las protaminas (Love and Kenney, 1999; Dadoune, 2003). La primera etapa implica la fosforilación y desfosforilación de la serina y residuos de la treonina de las protaminas (Dadoune, 2003). Este proceso facilita una correcta unión a ADN, mientras que la desfosforilación está asociada con un aumento de la condensación de la cromatina espermática (Dadoune, 2003). La persistencia de las protaminas fosforiladas en los espermatozoides eyaculados del toro, verraco, humano

y caballo es debido a un proceso de desfosforilación incompleto (Marushige and Marushige, 1978). Esta desfosforilación incompleta, al menos en el hombre y ratón provoca inestabilidad de la estructura de la cromatina (Wouters-Tyrou et al., 1998; Belokopytova et al., 2005). La segunda etapa implica la estabilización de la cromatina por la formación del puente disulfuro formado entre los grupos de tiol de cadenas de protamina adyacentes (Dadoune, 2003), donde el  $Zn^{2+}$  juega un papel importante previniendo una excesiva formación de puentes disulfuro mediante un mecanismo sencillo. El  $Zn^{2+}$  forma puente entre los grupos tiol de la cisteína de protamina con los grupos imidazol de la histidina (Bjorndahl and Kvist, 2010). La eficacia de la formación de los puentes disulfuro intramoleculares depende de la posición adecuada y la unión al ADN que es dependiente del proceso de fosforilación-desfosforilación (Marushige and Marushige, 1978; Balhorn et al., 1984). Por otro lado, la estabilización de la cromatina en parte depende de la presencia de  $Zn^{2+}$  presente en el plasma seminal después de la eyaculación (Bjorndahl and Kvist, 2010).

El número de puentes disulfuro de protaminas en espermátidas maduras y en espermatozoides epididimarios demuestran que la estabilización de la cromatina comienza en el testículo y sigue durante el paso del espermatozoide por el epidídimo (Dadoune, 2003). Asimismo, los grupos sulfhidrilos de la cisteína del espermatozoide testicular se oxidan para formar puentes disulfuros durante el tránsito epididimario (Balhorn et al., 2000; Brewer et al., 2002; Brewer et al., 2003). Los niveles de dichos puentes en los espermatozoides eyaculados pueden ser críticos en el proceso de la descondensación de la cromatina después de la fecundación ya que este fenómeno depende del número de puentes disulfuros presentes en núcleo espermático (Love and Kenney, 1999).

La estructura de la cromatina está desarrollada para ser sumamente resistente a las condiciones adversas que podrían dañar el ADN. Además esta estructura tiene propiedades que facilitan que el ADN esté disponible rápidamente en el ooplasma una vez que el ovocito haya sido fecundado. Por tanto, un defecto en la compactación de la cromatina (por defecto o por exceso) conlleva a una alteración en la fertilidad. Una compactación reducida facilitaría el acceso al ADN de agentes potencialmente nocivos y por otro lado, una compactación exagerada pondría en peligro la rápida liberación y distribución del ADN del espermatozoide en el ooplasma. Por consiguiente, se deben tener en cuenta todos los factores que afectan la compactación de la cromatina para comprender cualquier proceso patológico que pudiera surgir durante la manipulación espermática (Bjorndahl and Kvist, 2010).

#### 4.5. Epidídimo

Anatómicamente, el epidídimo es un tubo sinuoso que conecta los conductos eferentes que salen del testículo con el conducto deferente. Los túbulos seminíferos se unen para formar la rete testis que a su vez da lugar a los conductos eferentes, a una serie de 4 a 20 túbulos, el número depende de la especie (Hemeida et al., 1978; Robaire et al., 2006). Estos túbulos se unen nuevamente para formar un solo conducto altamente enrollado que es extremadamente largo y varía en longitud de 1 m en ratón (Takano et al., 1981), 3 metros en ratas y de 3 a 6 metros en humano (Robaire et al., 2006). En caballo, el epidídimo tiene una longitud de unos 70 m (Sostaric et al., 2008).

##### 4.5.1. Estructura del epidídimo

El epidídimo en caballo está localizado sobre el testículo, se puede dividir en varios segmentos o regiones histológicamente diferentes: segmento inicial (cabeza), cuerpo, cola (Samper, 2009).

La cabeza del epidídimo es una estructura aplanada que se encuentra dorsomedialmente en el borde craneal de los testículos y se encuentra estrechamente conectado a éste. El cuerpo se encuentra a lo largo de la cara dorsolateral de cada testículo y continúa como cola, ésta es una estructura grande conectada al polo caudal de los testículos (Samper, 2009) (Figura 4.2.).

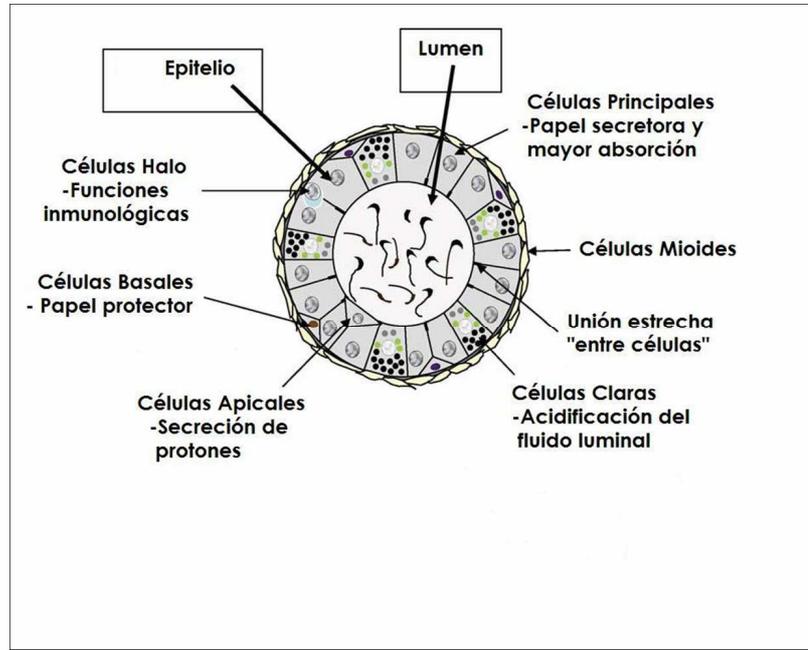
**Figura 4.2.** Imagen de testículo y de las diferentes regiones del epidídimo de caballo



En todas las especies de mamíferos estudiadas hasta el momento, cada región de epidídimo lo conforman los conductillos eferentes separados por tabiques de tejido conectivo. Estos tabiques no solo sirven como ayuda interna para el órgano, sino que también intervienen en la separación funcional entre los lobulillos lo que permite la expresión selectiva de genes y proteínas dentro de los lóbulos individuales (Turner et al., 2003).

A lo largo de toda su longitud, la luz del epidídimo está revestida por un epitelio pseudestratificado compuesto por células principales, células apicales, células estrechas, células claras, células basales y células halo (Figura 4.3).

**Figura 4.3.** Representación a modo de esquema de las células epididimarias y de su función (tomada y modificada de (Cornwall, 2009))



#### 4.5.2. Función del epidídimo

En los mamíferos el epidídimo tiene numerosas funciones que se relacionan entre sí, como son la protección, el transporte, la concentración, la maduración y el almacenamiento espermático (Tramer et al., 1998).

Los espermatozoides al ser transportados a través del epidídimo se someten a importantes alteraciones morfo-funcionales como es la adquisición de la motilidad, la estabilización de la pieza intermedia y el acrosoma (Barth and Oko, 1989; Hafez and Hafez, 2000), modificaciones en la cromatina del núcleo (Hingst et al., 1995), la migración de la gota citoplasmática desde la región del cuello hacia la porción final de la cola, la modificación del tamaño de acrosoma (Hafez and Hafez, 2000), la reabsorción del líquido secretado por los túbulos seminíferos, la maduración, el almacenamiento (Jones, 2004), el transporte y la especialización de los espermatozoides (Robaire et al., 2006).

La principal función de la región de la cabeza y el cuerpo del epidídimo es la de maduración espermática, mientras que la región de la cola participa principalmente en el almacenamiento de los espermatozoides antes de la

eyaculación. La composición y el microambiente del medio luminal en la cola del epidídimo permite a los espermatozoides sobrevivir durante varias semanas (Moore, 1995), ya que se mantienen en un estado de quiescencia metabólica y se previene de la actividad espermática prematura. Durante el periodo de almacenamiento en la cola de epidídimo se acumula suficiente número de espermatozoides (el 61% del total de espermatozoides epididimarios) así como en el conducto deferente y en la ampolla, estando disponibles para la eyaculación (Gebauer et al., 1974a; Sullivan et al., 2007).

La función del epidídimo está regulada por los andrógenos, especialmente por la dihidrotestosterona, aunque en los caballos también está regulada por los estrógenos. En los sementales, los receptores de andrógenos se distribuyen en los testículos, los epidídimos y la próstata (Bilinska et al., 2005), expresándose en las células de Sertoli, células mioideas peritubulares, células de Leydig y en las células perivasculares del músculo liso en el testículo (Pearl et al., 2011).

#### **4.5.2.1. Protección**

Los mecanismos de defensa están presentes tanto en las células espermáticas como en el fluido epididimario (Tramer et al., 1998). Las células epididimarias a través de las uniones estrechas forman una barrera hemato-epididimario que permite al epidídimo crear un microambiente adecuado que favorece la maduración del espermatozoide. Posee una serie de mecanismos de defensa que ayudan a proteger a los espermatozoides del sistema inmune, xenobióticos nocivos, y las especies reactivas de oxígeno (ROS). Los mecanismos de defensa incluyen la síntesis y secreción de proteínas específicas, la rápida eliminación de los posibles agentes nocivos a través de la síntesis y secreción de enzimas antioxidantes como el glutatión y la taurina y las enzimas conjugadas (Robaire et al., 2006).

Los espermatozoides al alcanzar la cola de epidídimo encuentran un ambiente hiperosmótico que asegura la protección frente posibles cambios en la osmolaridad que pudieran modificar su volumen (Robaire et al., 2006). Al incrementar la osmolaridad del medio se produce una deshidratación parcial de los espermatozoides que favorecería el almacenaje de las células y de esta forma se prolonga la vida de las mismas durante el periodo de almacenamiento en la cola del epidídimo (Crichton et al., 1994).

El epidídimo dispone de un sistema para asegurar que los espermatozoides se encuentren protegidos del estrés oxidativo a medida que maduran a lo largo de su

conducto. Cada región o segmento del epidídimo ha desarrollado sus propios mecanismos de protección del espermatozoide. En primer lugar, la actividad metabólica varía de una región a otra, con lo que diferentes especies reactivas de oxígeno (ROS) deben ser eliminados adecuadamente y, en segundo lugar, los espermatozoides se encuentran en diferentes estados de madurez en cada región, y por lo tanto, difieren con respecto a la susceptibilidad frente al daño oxidativo.

El fluido luminal de la cabeza de epidídimo está altamente oxigenado (Free et al., 1976). Las células epiteliales están rodeadas por una densa red de capilares (Suzuki, 1982), con un flujo sanguíneo superior al de las regiones distales del epidídimo. Además las células del segmento inicial son metabólicamente muy activas. Por tanto los espermatozoides al entrar en el segmento inicial deben estar especialmente protegidos frente a los agentes ROS. Por lo que no es de extrañar que el segmento inicial exprese enzimas antioxidantes (Hinton et al., 1996).

En la cola del epidídimo, las células epiteliales también son metabólicamente activas y los espermatozoides están continuamente expuestos a un ambiente rico en oxígeno. Sin embargo, hay menos vascularización en comparación con el segmento inicial (Robaire et al., 2006).

Los antioxidantes más importantes encontrados en el epidídimo son las enzimas catalasa, superóxido dismutasa (Nonogaki et al., 1992; Perry et al., 1993), gamma ( $\gamma$ )-glutamil transpeptidasa (Palladino et al., 1994), glutatión transferasa (Robaire and Hales, 1982; Veri et al., 1994; Montiel et al., 2003), e indolamina dioxigenasa (Yoshida et al., 1980). Además, la luz del epidídimo contiene compuestos no enzimáticos con acción antioxidante como el glutatión, la taurina y el triptófano. Cada una de estas enzimas y moléculas con actividad antioxidante se encuentran en diferentes niveles a lo largo del epidídimo (Robaire et al., 2006).

#### **4.5.2.2. Transporte de espermatozoides en el epidídimo**

Los espermatozoides, una vez liberados en el lumen de los túbulos seminíferos, son transportados a través de los conductos eferentes y comienzan su desplazamiento por el epidídimo.

Aunque la longitud del epidídimo varía entre especies (Sostaric et al., 2008), la duración media del tránsito de los espermatozoides del epidídimo es constante. En el caballo, el tiempo de tránsito del epidídimo se ha demostrado que varía entre 5 y 14 días (França et al., 2005). Para medir la duración de este tránsito se han utilizado varios

métodos. El método más directo es la incorporación de un marcador en el ADN de las células germinales de las espermatogonias y seguir la progresión de la primera oleada de espermatozoides marcados en el epidídimo. Este método permite medir el tiempo mínimo requerido para el paso de los espermatozoides a través del epidídimo (Robaire et al., 2006).

Los espermatozoides entran en el epidídimo propulsados por el fluido testicular y las células ciliadas de los conductos eferentes (Kirton et al., 1967). Los movimientos de los espermatozoides a través del epidídimo se deben principalmente a las continuas contracciones peristálticas de los músculos lisos en la región de la cabeza y del cuerpo del epidídimo. Estas contracciones musculares son el resultado de la estimulación por la secreción y liberación de andrógenos. En la cola de epidídimo los músculos lisos están generalmente en reposo, y reciben menos estímulos para contraerse (Robaire et al., 2006).

#### **4.5.2.3. Concentración**

El aumento de la concentración de espermatozoides entre el conducto eferente y la cola de epidídimo se produce debido a la reabsorción de fluidos. Un 75-95% del fluido testicular se reabsorbe durante el transporte de los espermatozoides hasta la parte media de la cabeza del epidídimo (Turner, 2002; Robaire et al., 2006). De hecho, gran parte de esta reabsorción se produce en el conducto eferente donde los receptores de estrógenos juegan un papel importante en su regulación y en la expresión de las proteínas implicadas en la reabsorción de líquidos (Hess, 2003).

En la especie equina como la secreción de las glándulas accesorias representa aproximadamente el 95% del volumen total de un eyaculado (Frazer and Bucci, 1996a), es importante que la densidad intraluminal de la cola de epidídimo sea alta para asegurar una adecuada concentración de espermatozoides en el eyaculado. Por ese motivo, la función de la concentración de espermatozoide en el epidídimo y los mecanismos celulares que regulan son importantes para obtener un eyaculado con los espermatozoides suficientes para que tenga lugar la fecundación (Turner, 2008)

#### **4.5.2.4. Maduración**

En la mayoría de los vertebrados, al menos con fecundación interna, el epidídimo es fundamental para la maduración post-testicular y el almacenamiento de los espermatozoides (Jones, 1998a). Sin embargo, se han estudiado muy pocos

aspectos de la función del epidídimo en el caballo, aunque la combinación de estos pocos estudios junto con datos de otras especies ha permitido proponer un marco básico de cómo se modula la maduración de los espermatozoides en la especie equina durante su tránsito por éste órgano.

La maduración epididimaria se caracteriza por sucesivos cambios morfológicos y fisiológicos que afectan a los gametos en regiones muy específicas (Dacheux et al., 2003). Los espermatozoides formados durante la espermatogénesis y espermiogénesis en los testículos están en reposo y, por tanto, no desempeñan ningún papel activo en su propio medio de transporte (Moore, 1995).

Cuando los espermatozoides entran al epidídimo están maduros pero son inmóviles o con una movilidad muy limitada y no son capaces de fecundar al ovocito (Sostaric et al., 2008). La adquisición de la capacidad fecundante se produce durante el tránsito epididimario y es el proceso que define la maduración de los espermatozoides, donde la capacidad de fecundación se refiere a la capacidad de penetrar un ovocito fisiológicamente normal y estructuralmente intacto, ya sea in vivo o in vitro. Los espermatozoides alcanzan su pleno potencial fecundante cuando llegan a la cola del epidídimo (Sostaric et al., 2008).

La maduración de los espermatozoides incluye muchos cambios en las propiedades fisiológicas tales como adquisición de la motilidad, la capacidad de reconocimiento y unión a la zona pelúcida y finalmente la capacidad de fusionarse con la membrana plasmática del ovocito.

#### **4.6. Plasma seminal**

El plasma seminal (PS) es una secreción fisiológica de múltiples glándulas del aparato reproductor masculino que juega un papel importante en la maduración final de los espermatozoides a través de cambios hormonales, enzimáticos, cambios que ocurren en la superficie de la membrana. Funciona como vehículo para los espermatozoides eyaculados, proporciona energía y protección frente a los cambios de presión osmótica y frente a la oxidación (Kareskoski and Katila, 2008; Muiño-Blanco et al., 2008). La composición del PS difiere entre especies y entre individuos de la misma especie. Contiene una cantidad variable de componentes bioquímicos (Muiño-Blanco et al., 2008), presenta altos niveles de nucleasas, nucleotidasas y enzimas lisosomales (proteinasas, fosfatasa, glicosidasas y enzimas mucolíticas especialmente hialuronidasa) (Lutwak-Mann, 1981).

Además, ciertos componentes del PS desempeña un papel importante como antioxidantes protegiendo a los espermatozoides de especies reactivas de oxígeno (ROS) que son producidos por las propias células espermáticas y por los leucocitos (Ball et al., 2001; Baumber et al., 2002). La protección frente a los ROS se lleva a cabo por los antioxidantes no enzimáticos como taurinas e hipotaurina (Alvarez and Storey, 1989),  $\alpha$ -tocopherol (la vitamina E), el ácido ascórbico (Lipovac, 2000), el glutati6n (Sikka, 2004), el ácido úrico y el piruvato (de Lamirande and O'Flaherty, 2008) o antioxidantes enzimáticos como la super6xido dismutasa (SOD), catalasa y glutati6n peroxidasa (GPx) (de Lamirande et al., 1997b; Sikka, 2004).

El plasma seminal contiene otras mol6culas como la glicerilfosforilcolina (GPC) que se produce en el epid6dimo de caballo en cantidades inferiores a 100 mg/dl o la ergotionina que se produce en la ampolla con una concentraci6n de 20-60 mg/dl (Mann, 1975). Entre los ácidos orgánicos encontramos el lactato, ascorbato, el ácido cítrico que oscila en un rango de concentraci6n de 8-53 mg/dl, el citrato es un producto de la secreci6n de las glándulas vesiculares no sólo en caballo sino también en bovino, ovino y en porcino (Mann, 1975). En la especie humana, procede principalmente de la próstata. El ácido cítrico en el plasma seminal junto con el calcio intervienen en el mantenimiento del equilibrio osm6tico (Mann, 1975). Las proteínas son los contribuyentes más importantes para las funciones de los espermatozoides en los mamíferos (Maxwell et al., 2007). Según estudios realizados por (Pickett et al., 1976) el pH del plasma seminal de caballo puede oscilar entre 7'47y 7'59 y la osmolaridad entre 300 a 302 mOsm.

#### **4.6.1. Proteínas de plasma seminal y sus funciones**

Como hemos comentado anteriormente, las proteínas de plasma seminal son proteínas secretoras procedentes en su mayoría del epid6dimo y las glándulas sexuales accesorias. Están involucradas en la remodelaci6n de la superficie de los espermatozoides que se produce durante el tránsito de los mismos a través del tracto genital masculino y continúa posteriormente en la eyaculaci6n (Topfer-Petersen et al., 2005).

Se ha demostrado que las proteínas de plasma seminal intervienen en los primeros pasos de la fecundaci6n, por ejemplo, en la estabilizaci6n de los espermatozoides en el reservorio espermático oviductal, modulaci6n de la capacitaci6n, transporte de los espermatozoides en el tracto genital femenino,

modulación de la respuesta inmune en el útero y en la interacción entre los gametos (Topfer-Petersen et al., 2005).

El contenido proteico de PS de caballo es relativamente bajo (10 mg/ml) en comparación con otros mamíferos que contienen de 20 a 60 mg/ml (Topfer-Petersen et al., 2005).

Las principales proteínas de plasma seminal de caballo pertenecen a tres grupos de acuerdo a sus propiedades químicas: las proteínas que contienen el dominio fibronectina tipo II (Fn-2), proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISPs) y espermadhesina (Topfer-Petersen et al., 2005).

### **Proteína FN-2**

Las proteínas Fn-2, normalmente se unen a los fosfolípidos de la membrana de los espermatozoides, preferentemente al grupo de fosforilcolina como fosfatidilcolina o esfingomielina causando cambios en la estructura de la membrana (Greube et al., 2004; Ekhlas-Hundrieser et al., 2005). Las proteínas Fn-2 han sido identificadas en el tracto genital de numerosos mamíferos, son las proteínas que más abundan en el plasma seminal bovino (Manjunath and Sairam, 1987), cabra (Villemure et al., 2003), bisonte (Boisvert et al., 2004) y en caballo (Calvete et al., 1995; Menard et al., 2003). Un miembro de esta familia de proteína también ha sido descrito en el plasma seminal porcino aunque en menor cantidad (Calvete et al., 1997). Las proteínas HSP-1, HSP-2 y EQ-12 se identificaron como las principales proteínas del plasma seminal de caballo (Ekhlas-Hundrieser et al., 2005).

Las proteínas Fn-2 se expresan en diferentes regiones del tracto genital masculino. La EQ-12 se producen en el cuerpo y en la región de la cola de epidídimo, mientras que la familia de las proteínas HSP-1 y HSP-2 son sintetizadas en gran parte por la ampolla del conducto deferente (Saalman et al., 2000; Ekhlas-Hundrieser et al., 2005). Estas proteínas se adhieren a la superficie de los espermatozoides durante el tránsito epididimario y están presentes en los espermatozoides eyaculados. Una de las características más destacadas de las proteínas Fn-2 es la capacidad de interactuar con los fosfolípidos de la membrana de los espermatozoides y su capacidad de unión a heparina (Calvete et al., 1997).

Las proteínas HSP-1 y HSP-2 (también llamadas SP-1 y SP-2) son las proteínas que más abundan en el plasma seminal de caballo, representando el 70-80% de proteínas

totales. Junto con las proteínas de unión a heparina, se piensa que modulan el proceso de la capacitación. Son proteínas de cadena corta de tipo Fn-2 y son similares a las principales proteínas de unión a heparina bovina que han sido asociados a la capacitación (Ekhlas-Hundrieser et al., 2005).

### **Proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISPs)**

En el segundo grupo de las proteínas de PS de caballo están las proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISPs). La CRISP-3, es la más importante en caballo, tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kDa. Los estudios realizados por diversos autores (Magdaleno et al., 1997; Schambony et al., 1998) han demostrado que esta proteína se expresa predominantemente en la ampolla de conducto deferente contribuyendo así a que haya una alta concentración de CRISP-3 en el plasma seminal. También se han identificado otras proteínas de esta familia en el testículo y en el epidídimo (CRISP-1 y CRISP-2) (Topfer-Petersen et al., 2005).

Estas proteínas están implicadas en la fusión de espermatozoide-ovocito y en el plasma seminal en el tracto genital femenino, desempeñan una función de defensa innata y de bloqueo de canales iónicos (Topfer-Petersen et al., 2005).

Se ha demostrado que la HSP-3 es miembro de la familia de las proteínas CRISPs (Schambony et al., 1998). CRISP es una proteína que se encuentra en los vertebrados y su presencia no se limita nada más al tracto genital masculino. El primer miembro de esta familia fue descrito en el conducto epididimario de rata, previamente designado como DE-protein (Cameo and Blaquier, 1976). Esta proteína participa directamente en la fusión de espermatozoide-ovocito (Ellerman et al., 2002)

### **Espermadhesinas**

El tercer grupo de las proteínas de PS lo forma las espermadhesinas. Estas proteínas sólo se han identificado en las especies de ungulados hasta la fecha (porcina, bovina y equina) (Reinert et al., 1997; Haase et al., 2005).

La proteína AWN es homóloga a la HSP-7 hallada en plasma seminal de caballo, es una proteína de unión a los carbohidratos y también se ha demostrado

que se une a la zona pelúcida intacta de yegua interviniendo en la interacción espermatozoide-ovocito (Calvete et al., 1995; Reinert et al., 1997; Haase et al., 2005).

Según los estudios inmunohistoquímicos realizados, indican que la proteína AWN en caballo y en cerdo se secreta en diferentes partes del tracto genital masculino. La AWN, se detectó por primera vez en espermatogonias y posteriormente en la rete testis, epidídimo y en la vesícula seminal. Se ha detectado la proteína AWN en algunos espermatozoides aislados de caballo y su cantidad incrementa durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo. En los espermatozoides de caballo se detecta sobre todo en la región ecuatorial mientras que en los espermatozoides de cerdo se localiza en la región acrosomal (Reinert et al., 1997; Hoshiba and Sinowitz, 1998).

(Calvete et al., 1994), han caracterizado y enumerado los principales grupos de proteínas de PS de caballo. Ocho proteínas de bajo peso molecular entre 14-30 kDa fueron identificadas como proteínas de plasma seminal de caballo (HSP-1 a HSP-8). Todos estos grupos de proteínas excepto la HSP-4 fueron vinculados a la superficie de los espermatozoides.

HSP-4 está relacionada con un gen de la calcitonina. En el plasma seminal humano y de ratón se ha demostrado que los niveles de calcitonina están correlacionados con la motilidad espermática (Mungan et al., 2001) y evitan una capacitación y reacción acrosómica espontánea mediante la regulación a través del AMPc (Fraser et al., 2005).

La HSP-5 no se ha podido correlacionar con las proteínas conocidas. La secuencia de N-terminal no corresponde con la secuencia de ninguna proteína funcionalmente caracterizada de otras especies (Topfer-Petersen et al., 2005).

La HSP-6 y HSP-8 son diferentes isoformas de una proteína que pertenece a la familia de la proteína kallikreinlike. Las secuencias de N-terminal de ambas isoformas mostraron un alto grado de homología con el antígeno específico de la próstata humana (PSA) que interviene en la disgregación del coágulo seminal y liberación de los espermatozoides móviles (Jonsson et al., 2005; Topfer-Petersen et al., 2005).

La estructura primaria de HSP-7 es una proteína de 14kDa aislada en el plasma seminal de caballo. Ha sido identificada como el único miembro de la familia espermadhesina, al igual que su homólogo porcino AWN-1 con el que comparte un 98% de identidad o similitud de secuencia (Reinert et al., 1997). Estas proteínas pueden estar implicadas en diversos pasos previos a la fecundación (establecimiento de

reservorio espermático en el tracto genital femenino y capacitación) y posteriormente en la interacción de los espermatozoides con la zona pelúcida.

Entre otras proteínas que se pueden encontrar en el PS de caballo está la enzima arilsulfatasa cuya función es eliminar los sulfatos, facilitando la capacitación o deteriorando a los espermatozoides. En cerdo por ejemplo, se ha encontrado hasta un 85% en PS y sólo un 13% se ha detectado en espermatozoide (Gadella et al., 1991). Asimismo está presente otra proteína denominada factor de inducción de la ovulación (OIF), también presentes en otras especies como alpaca, bovina, porcina y ratón (Bogle et al., 2011).

**Tabla 4.3.** Principales proteínas del plasma seminal de caballo

Grupos de proteínas	Proteínas	Localización	Función
<b>Fibronectina tipo II Fn-2</b>	HSP-1, HSP-2, EQ-12	Ampolla de conducto deferente. Cuerpo y cola de epidídimo	Interactuar con los fosfolípidos de la membrana de los spz Unión a heparina
<b>CRISPs</b>	HSP-3	Ampolla de conducto deferente. Glándula salivares	Fusión spz-ovocito D defensa innata en PS y tracto genital femenino Bloqueo canales iónicos
<b>Espermadesina</b>	HSP-7	Espermatogonia. Rete testis, Epidídimo. Vesícula seminal	Capacitación Interacción espermatozoides – zona pelúcida
<b>Arilsulfatasa</b>	enzima	Plasma seminal Espermatozoides	Elimina sulfato de glicoconjugados sulfatados
<b>factor de inducción de la ovulación</b>	OIF	Plasma seminal	Inducción ovulación

#### **4.6.2. Ácidos grasos del plasma seminal**

Los lípidos constituyen unas de las fuentes más importantes de energía en el metabolismo de las células espermáticas (Lenzi et al., 1996). Igualmente, el conocimiento de la composición química del PS es fundamental para comprender mejor el funcionamiento bioquímico de las células que contienen (Martínez-soto 2013). Aunque se ha investigado mucho sobre la composición del semen, muy pocos estudios se han realizado sobre el contenido lipídico del plasma seminal en la especie equina (Komarek et al., 1965). Según estos autores (Komarek et al., 1965) el plasma seminal equino contiene 172 y 4'2 mg/100 ml de lípidos y colesterol respectivamente. (Hartree and Mann, 1959) sólo encontraron trazas de plasmalógenos en el plasma seminal y el contenido de compuestos relacionados con glicerilfosforilcolina reportado por (Dawson et al., 1957) es de 76 mg/100 ml en caballo.

(Komarek et al., 1965) determinaron que el plasma seminal de caballo tiene 74'4% de fosfolípidos, 12'1% de colesterol, 3'6% de diglicéridos, 3'2% de triglicéridos y 6'7% de ésteres de cera. Por lo general, el contenido lipídico del plasma seminal en caballo es bajo, siendo aproximadamente sólo un 2 % de la materia seca. No obstante, es mayor que el contenido en el plasma seminal de toro (Komarek et al., 1965) o de verraco (Komarek et al., 1965). Además se ha observado una mayor variación del porcentaje de lípidos en el plasma seminal entre sementales que entre las distintas fracciones del eyaculado.

Los fosfolípidos son los compuestos lipídicos que más abundan en el plasma seminal de caballo, junto con el colesterol, representan el 90% de los lípidos del plasma seminal. Los lípidos neutros sólo están presentes en pequeñas cantidades (Komarek et al., 1965).

#### **4.6.3. Obtención de espermatozoides de epidídimo**

En el epidídimo de los caballos existe un número elevado de espermatozoides maduros con capacidad fecundante (Morris et al., 2002). Existen varios métodos de obtener espermatozoides de esta región entre los que se encuentran la técnica de flotación mediante cortes realizado en el epidídimo, el lavado retrogrado del epidídimo con un medio líquido y la aspiración (Sharma et al., 1997; Cary et al., 2004). Estas técnicas también han sido descritas en otros animales entre las que se incluyen los cervidos (Zomborszky et al., 1999; Hishinuma et al., 2003), los perros (Marks et al.,

1994; Hewitt et al., 2001), los machos cabrios (Blash et al., 2000) y en la clínica humana (Sharma et al., 1997).

La técnica de flotación consiste en colocar el epidídimo en un medio de cultivo y hacer cortes en la pared de la cola de epidídimo mediante el uso de un bisturí o aguja. Esta técnica se utiliza de forma rutinaria para obtener muestras espermáticas de pequeños roedores (ratón, rata, hamster, etc...) y también se ha usado para especies domésticas (Garde et al., 1994; Cary et al., 2004).

El lavado retrógrado consiste en inyectar el medio con una jeringa a través del vaso deferente y ejercer presión hasta obtener los espermatozoides (Braun et al., 1994; Garde et al., 1994; Comizzoli et al., 2001; Cary et al., 2004). Por otra parte, la técnica de aspiración, la cual se aplica en la clínica andrológica humana, consiste en realizar un abordaje con microcirugía del epidídimo y posteriormente obtener los espermatozoides mediante aspiración (Sharma et al., 1997). Una técnica similar con una fistula se ha empleado para hacer continuas recogidas de células epididimarias tanto de roedores como de toros (Bennett and Rowson, 1963; Gilmore et al., 1971)

#### **4.7. El uso del espermatozoide de epidídimo en caballo y en otras especies domésticas, salvajes y en las especies en peligro de extinción**

Como mencionábamos anteriormente, desde tiempos remotos el caballo ha sido de gran utilidad al hombre en diversos campos, sin embargo es a nivel de las competiciones deportivas donde ha alcanzado su mayor significación y popularidad (Endenburg, 1999; Hughes et al., 2005). La explotación de caballos destinados a los deportes ha hecho nacer un lucrativo negocio, como lo demuestra la crianza de caballos para polo en Argentina, caballos para salto y carreras en Inglaterra y los Estados Unidos, rodeo, charrería... Otros eventos deportivos en el que el caballo juega un importante papel son: Las carreras de hipódromo, las carreras parejeras, las carreras de endurance, el salto y concurso completo, la equitación, las competiciones hípcas de todo tipo concursos de salto, pruebas de doma y habilidad, pruebas de campo (Campos et al., 2007). La famosa gran carrera nacional de obstáculos que se celebra en el Reino Unido es visto por aproximadamente 600 millones de personas en todo el mundo (Proudman et al., 2004)

En el caso de los caballos deportivos, depende de la disciplina y la preferencia del jinete o propietario, si es garañón, caballo castrado o yegua. El caballo castrado es preferido por tener un temperamento más parejo y confiable que las yeguas o

garañones en situaciones de competencias. El castrado no desvía tanto su atención hacia otros caballos como el garañón, tampoco presentan cambios en el comportamiento por el alboroto que puede causar el ciclo hormonal, como en el caso de las yeguas (Deraga, 2007). Así mismo, los caballos castrados en una manada se hacen amigos de las yeguas y es raro que peleen entre ellos (Lux, 2010).

Estos animales suelen ser castrados generalmente a los 24 meses de edad, cuando alcanzan su madurez sexual (Campos et al., 2007; Lux, 2010), aunque no se ha visto diferencia en la tasa de crecimiento entre machos castrados a los 2 días y a los 2 meses comparado con machos castrados a los 12 meses antes de demostrar su capacidad fecundante (Campos et al., 2007). Sin embargo, si estos animales se castran tarde (4-5 años de edad) pueden mantener instintos muy pronunciados de macho y pueden montar las yeguas aún sin poderlas fecundar.

Por otro lado se sabe que no todos los potenciales genéticos de los padres son heredables, así mismo puede darse el caso de que los hijos tengan mejor potencial que sus padres, la selección genética de la descendencia es un proceso largo y lento, ya que uno de los índices de selección sobre la descendencia es su repetitividad en cuanto a su rendimiento durante todo el año en la competición y sólo a partir del segundo o tercer año de la competición que se puede tener alguna idea del potencial del animal en causa (Langlois, 1980; Campos et al., 2007). De ahí la importancia de conservar el material genético de estos animales (Campos et al., 2007).

Los espermatozoides de epidídimo presentan ciertas características que los diferencia de los eyaculados. Cuando los espermatozoides son liberados por los testículos, aunque son morfológicamente maduros, funcionalmente son incompetentes, no son capaces de ejercer una motilidad progresiva e unirse a la zona pelucida hasta que no alcanzan la porción distal del epididimo (Cornwall, 2009).

Otras características fundamentales que presentan los espermatozoides epididimarios es que son más resistentes al choque de frío que los espermatozoides eyaculados, por tanto, pueden ser potencialmente mejores candidatos para la criopreservación que los espermatozoides eyaculados (James, 2004). Estudios realizados por (Magistrini et al., 1988; Tiplady et al., 2002) compararon espermatozoides de epidídimo y eyaculados observando que aquellos que procedían del epidídimo presentaron mejor motilidad después de la descongelación. Resultados similares han sido encontrados por otros autores. También se ha demostrado que los espermatozoides de epidídimo se pueden utilizar en la inseminación artificial,

fecundación in vitro, e ICSI con resultados satisfactorio. La recuperación y conservación de los espermatozoides de epidídimo permitiría el uso de materiales genéticos valiosos de reproductores que han muerto repentinamente o han sido sacrificados. También permitiría el uso de materiales genéticos de machos que han perdido la libido o que presentan lesiones o algún problema en el tracto genital (Guerrero, 2006). (Lone et al., 2011) Consideraron que la obtención y conservación de los espermatozoides epididimarios postmortem es un método eficaz y plausible para abordar el problema de la endogamia en sitios como zoológicos, centros de acogida para animales y/o refugios privados de animales. Además, uno de los objetivos de la conservación es mantener una población animal sana y genéticamente diversa. Como comentábamos anteriormente los bancos genéticos pueden contribuir positivamente a este fenómeno, proporcionando una fuente de genes que pueden ser infundidos en pequeñas poblaciones de animales o poblaciones fragmentadas y así contrarrestar los efectos negativos de la selección no natural, deriva genética y depresión endogámica (Wildt et al., 1987; Wildt et al., 1997).

Existe una enorme dificultad en el desarrollo y aplicación de las tecnologías para conseguir una gestación con éxito en los équidos salvajes, posiblemente debido al conocimiento limitado que se tiene de la fisiología de la reproducción de éstas especies así como por la dificultad en la manipulación de los mismos. Ejemplo de ello son el caballo przewalski's y (Holt and Lloyd, 2009) o la cebra grevy's (Asa and Moehlman, 2002). Incluso en la aplicación de técnicas básicas como la inseminación artificial y transferencia embrionaria, sin contar con las técnicas de reproducción asistida más avanzadas (Hinrichs, 2010), que se tendrían de optimizar mejor en caballo doméstico antes de trasplantarlo a équidos en peligro extinción (Smits et al., 2012). Teniendo en cuenta todas estas dificultades y como la población de equinos domésticos abunda, existe una buena oportunidad para investigar y desarrollar las técnicas de reproducción asistida y posteriormente aplicarlas en los animales salvajes (Adams et al., 2009) o los animales en peligro de extinción.

En los últimos años se ha acelerado el promedio de animales extintos debido al crecimiento exponencial de la población humana, se veía provocada por cambio climático y el empleo intensivo de recursos naturales (Smits et al., 2012). Según La Unión Internacional para la Conservación de Recursos y la Naturaleza (Roldan et al., 2006) el 23% de las especies están amenazadas, aunque se piensa que en mamíferos el porcentaje es mucho más alto en animales amenazados que otros grupos de animales (las aves por ejemplo) probablemente por la sobreexplotación de los mamíferos (Roldan et al., 2006).

Los ungulados son uno de los grupos de mamíferos con porcentaje más alto de especies amenazadas, debido a la caza intensiva como fuente de alimentación, la piel y los cuernos. De hecho, es el único grupo de mamíferos en el cual la caza es la causa más frecuente de amenaza de extinción en su hábitat natural (Roldan et al., 2006).

En la familia Equidae por ejemplo; se encuentran las cebras, los asnos o burros y los caballos. Los caballos domésticos, salvajes y asnos, existen en todos los continentes excepto en la Antártida, mientras que los équidos salvajes se limitan en Asia y en África. La Unión Internacional para la Conservación de Recursos y la Naturaleza (IUCN) han catalogado siete especies salvajes, burchelli, grevyi, zebra, africanus, hemionus, ferus y kiang, y varias subespecies de las cuales la mayoría están amenazada en cierto grado y otras consideradas extintas en su hábitat natural (Roldan et al., 2006).

Asimismo, la mayoría de los animales salvajes actualmente se encuentran en peligro de extinción, con un porcentaje más alto en los carnívoros y la familia felidae (Toyonaga et al., 2011), ejemplo, el gato salvaje Iriomote (*Felis Iriomotensis*), Tsushima gatos leopardo (*Felis bengalensis euphilura*) (Farstad, 2000), el lince ibérico considerado como el felino más amenazado en Europa (Gañán et al., 2010). El gato doméstico ha sido utilizado como modelo para investigar la calidad de espermatozoides de diferentes partes del epidídimo y los métodos de preservación (Tittarelli et al., 2006; Thuwanut et al., 2008; Toyonaga et al., 2010), así como los métodos de inseminación artificial (IA) (Toyonaga et al., 2011) empleando espermatozoides congelados de la cola del epidídimo.

Otro ejemplo que se puede citar es el búfalo africano (*Syncerus caffer*), perteneciente al grupo llamado "los 5 grandes de África". Se trata de un animal muy popular entre los cazadores, turistas y sobre todo entre los agricultores. Muchos búfalos en África austral son portadores de enfermedades como la fiebre aftosa (Herold et al., 2004), piroplasmosis (Potgieter et al., 1988), brucelosis y la tuberculosis (Herr and Marshall, 1981). La demanda de búfalos libres de cualquiera de estas enfermedades destinados para la reproducción y como trofeo de caza, supera la disponibilidad de estos animales (Herold et al., 2004).

Debido a la caza y a estas enfermedades, la población de los búfalos africanos se redujo bastante en el siglo XIX. La técnica de reproducción asistida permite la utilización de materiales genéticos de estos animales y la congelación de los espermatozoides de epidídimo, además de ser un método favorable para conservar estos materiales genéticos (Herold et al., 2004).



## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

En este apartado se detallarán los materiales utilizados en el trabajo experimental así como los protocolos y metodologías aplicadas.

La mayor parte de los reactivos empleados en la realización de los experimentos de esta tesis doctoral provienen de la empresa Sigma-Aldrich Química S.A (Madrid, España) salvo que se indique lo contrario.

### **5.4. Medios y soluciones de manipulación de gametos**

En términos generales, la preparación de los medios de manipulación empleados se realizó utilizando agua ultrapura (Milli-Q, Millipore Iberica S.A.U., Madrid). Una vez preparados se midió la osmolaridad (Automatic Micro-osmometer, Roebing, Berlin, Alemania) y el pH (Micro pH 2002, Crison Instruments, Barcelona) de los mismos. A continuación se esterilizaron mediante filtración a través de membranas con un diámetro de poro de 0'22  $\mu\text{m}$  (Millipore Iberica S.A.U., Madrid) en cabina de flujo laminar (Telstar, S. A, BH-100, Terrassa, España). Finalmente, los medios se conservaron en condiciones estériles a 4°C hasta el momento de su uso. El tiempo de conservación de los medios así preparados no excedió de un mes.

#### **5.4.1. Medio de manipulación de espermatozoides de epidídimo de caballo (TALP modificado)**

Este medio se utilizó para la manipulación, lavado y descongelación de los espermatozoides de epidídimo de caballo. Se trata de un medio basado en la solución de Tyrode suplementado con HEPES, polivinilpirrolidona, lactato, piruvato y antibióticos (Merkies and Buhr, 1998). Este medio está libre de calcio y magnesio (tabla 5.1). Una vez preparada la solución, se midió la osmolaridad que fue de 323 mosm/l y el pH se ajustó a 7'4.

**Tabla 5.1.** Composición del medio TALP modificado para la manipulación de espermatozoides de caballo (Merkies and Buhr, 1998)

Componentes	Concentración (mM)
NaCl (S-5886)	109
KCl (P-5405)	3'15
NaHCO <sub>3</sub> (S-5761)	1'99
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O (S-9638)	0'347
Hepes (H-4034)	8'468
Polivinilpirrolidona (PVP -360)	8'3
Lactato sódico (L-7900)	10'00
Piruvato sódico ( P-2256)	0'199
Estreptomina (S-9137)	0'068
Penicilina (P3032)	0'086

### 5.1.2. Tampón Fosfato salino de Dulbecco (PBS)

Para la realización de este trabajo se ha utilizado un medio tampón fosfato con calcio y magnesio, y un equivalente sin estos iones (tabla 5.2). El PBS con calcio y magnesio se suplementó con 1 mg/ml de alcohol de polivinilo (PVA, P-8136) y 0'005 mg/l de rojo fenol (P-3532), como indicador de pH, para la manipulación y lavado de los ovocitos bovinos y para la manipulación de los mismos después de la fecundación in vitro. Este mismo medio se suplementó con suero fetal bovino (SFB) al 10% el mismo día de su uso y se empleó en la manipulación de los espermatozoides durante la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

**Tabla 5.2.** Composición de los tampones fosfato

Componentes	PBS con calcio y magnesio D-8662 (g/L)	PBS libre de calcio y magnesio D-8537 (g/L)
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O (C-7902)	0'133	-
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O (M-2393)	0'1	-
KCl (P-5405)	0'2	0'2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (P-5655)	0'2	0'2
NaCl (S-5886)	8'0	8'0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (S-9638)	1'15	1'15

El PSB libre de calcio y magnesio (D-8537, Tabla 5.2) se utilizó para la manipulación e incubación de los espermatozoides en la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), así como en todos los pasos de lavado realizados con esta técnica.

### 5.1.3. Preparación de las soluciones de Percoll® para selección y lavado espermático

Las soluciones de Percoll® (GE Healthcare Europe GmbH, Barcelona) se elaboraron a partir de una solución stock de sales y HEPES preparada con agua ultrapura (Milli-Q) tal y como viene reflejado en la tabla 5.3.

A partir de ésta solución stock se preparó una solución isosmótica de Percoll® al 90% siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Parrish et al., 1995) y que se muestra en la Tabla 5.4. Finalmente, cada día de trabajo se prepararon las soluciones de Percoll® de 45 y 60% mediante diluciones de la solución de Percoll al 90% en medio de manipulación TALP modificado descrito anteriormente en el apartado 5.1.1. La solución stock se conservó como máximo 1 mes a 4°C, el resto de preparaciones se conservaron como máximo 2 semanas en refrigeración.

**Tabla 5.3.** Composición de la solución stock 10x

Componentes	mM
KCl (P-5405)	30'85
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O (S-9638)	28'98
NaCl (S-5886)	799'96
Hepes (H-4034)	99'87

**Tabla 5.4.** Solución de Percoll® 90% (Parrish et al., 1995)

Componentes	mM
Solución 10X stock	20 ml
NaHCO <sub>3</sub> (S-5761)	25'00
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O (C-1016)	1'95
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O (M-2393)	0'395
Lactato sódico (L-7900)	43'57
Percoll®	180'00 ml

Se utilizó un sistema de centrifugación en un gradiente de Percoll® para el lavado y selección de los espermatozoides de epidídimo congelados-descongelados con el objetivo de eliminar restos de la yema de huevo, glicerol y células espermáticas muertas.

#### 5.1.4. Medio de congelación espermática

El medio utilizado para la congelación de espermatozoides de epidídimo de caballo fue el descrito por (Tischner, 1979). En su composición incluye lactosa, yema de huevo y glicerol. Para su preparación se deben adicionar los componentes siguiendo el mismo orden descrito en la tabla 5.5 y es necesario esperar la completa disolución de un componente antes de añadir el siguiente con el fin de prevenir la precipitación de los mismos. Una vez finalizada la preparación del medio, se ajusta el pH a 7.4 y se mide la osmolaridad (887 mosm/l). Este medio se mantiene en continua agitación a 4°C hasta el momento de su uso en la cabina de refrigeración.

**Tabla 5.5.** Composición del medio de congelación de caballo (Tischner, 1979)

Componentes	Cantidad
Agua (Milli-Q, Millipore)	100 ml
Lactosa (L-3625)	11 g/100 ml (3.05 mM)
EDTA (E-4884)	0.1 g/100 ml (0.0034 mM)
NaHCO <sub>3</sub> (S-5761)	0.089 g/100 ml (0.010 mM)
Yema de huevo	3 ml
Glicerol (G-8773)	3.5 ml

#### 5.1.5. Medio de transporte y lavado del material biológico

Se utilizó una solución salina fisiológica (SSF, 0.9% p/v cloruro de sodio (S-9888) suplementado con 100 mg/l de sulfato de kanamicina (K-1377). El medio fue utilizado, por una parte, para el transporte y lavado de ovarios bovinos y por otra para el lavado de los testículos y epidídimos que llegaron al laboratorio.

#### **5.1.6. Medio de obtención y de manipulación de ovocitos bovinos**

Para la obtención de ovocitos se utilizó un medio TCM- 199 que incluye L-glutamina y sales de Hanks (M-0393) que fue suplementado con 1% alcohol de polivinilo (PVA) (P-8136), 4'2 mM de bicarbonato de sodio (S-5761) y 10 mM de Hepes (Sigma H-4034) (Edwards and Hansen, 1996). Se ajustó el pH a 7'4 y la osmolaridad fue de 301 mosm/l. El mismo día de su uso se suplementó con 2 mM de glutamina (G-5763), 50 IU/ml de penicilina (P-3032) y 50 µg/ml estreptomycin (S-9137) y seguidamente se atemperó en estufa (Memmert, Schwabach, Alemania) a 38'5°C antes de su empleo.

#### **5.1.7. Medio de maduración in vitro de ovocitos bovinos**

Para la maduración in vitro de los ovocitos bovinos se preparó una solución stock del medio de maduración TCM-199 (M-5017), cuya composición queda reflejada en la tabla 5.6 (Edwards and Hansen, 1996). Tras su preparación se ajustó el pH a 7'4 y se midió la osmolaridad (286 mosm/l). Posteriormente se filtró y se conservó en condiciones estériles a 4°C hasta el día de su uso. El medio TCM stock se suplementó en el mismo día de su uso con suero fetal bovino (FBS, Antibody BCN S. L., Barcelona), piruvato y glutamina (tabla 5.6) y se pasó nuevamente por un filtro de 0.22 µm.

#### **5.1.8. Medio de lavado y preparación de los espermatozoides (Sperm—TALP)**

Este medio se utilizó en la manipulación, lavado y capacitación de los espermatozoides de epidídimo de caballo previo a la fecundación in vitro. Se preparó siguiendo el protocolo descrito por (Parrish et al., 1988) (Tabla 5.7). Una vez preparado, se ajustó el pH a 7'4 y se midió la osmolaridad (287 mosm/l). Posteriormente se filtró (0'22 µm) y se conservó en condiciones estériles a 4°C un máximo de 1 mes. El medio SPERM-TALP se suplementó el mismo día de su uso y se filtró nuevamente con un filtro de 0'22 µm.

#### **5.1.9. Medio de fecundación in vitro (FIV-TALP)**

El medio de fecundación in vitro (FIV) que se utilizó fue el descrito por (Parrish et al., 1988) con ligeras modificaciones (tabla 5.8). Tras su preparación se ajustó el pH a 7'35 – 7'38 y se valoró la osmolaridad (282 mosm/l). A continuación se filtró y se conservó en

condiciones estériles a 4°C un máximo de 1 mes. El medio de fecundación se suplementó el mismo día de su uso y se filtró nuevamente con un filtro de 0'22 µm.

**Tabla 5.6.** Medio de maduración de ovocitos bovinos TCM

<b>Solución TCM stock</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Concentración</b>
TCM-199 (M-5017)	-
NaHCO <sub>3</sub> (S-5761)	26'20 mM
<b>TCM suplementado</b>	
TCM-199 stock	-
Suero fetal bovino (FBS)	10% v/v
Piruvato sodico (P-2256)	0'2 mM
L-Glutamina (G-5763)	2 mM
Gentamicina (G-1272)	50 g/ml

**Tabla 5.7.** Medio de lavado y preparación espermático SPERM-TALP

<b>Sperm-TALP stock</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Concentración (mM)</b>
NaCl (S-5886)	100'00
KCl (Sigma P-5405)	3'20
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O (S-9638)	0'30
Lactato sódico (L-7900) 4°C	21'50
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O (C-7902)	2'00
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O (M-2393)	0'40
Hepes (H-4034)	10'00
NaHCO <sub>3</sub> (S-5761)	25'00
<b>Sperm-TALP suplementado</b>	
Sperm-TALP Stock	-
BSA-FAF(A-6003)	0'60 %
Piruvato Na (P-2256)	1 mM
Gentamicina (G1272)	50 µg/ml

**Tabla 5.8.** Medio de fecundación in vitro de ovocitos bovinos FIV- TALP

<b>FIV-TALP stock</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Concentración (mM)</b>
NaCl (S-5886)	114'00
KCl (P-5405)	3'20
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O (S-9638)	0'30
Lactato sódico (L-7900) 4°C	10'00
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O (C-7902)	2'00
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O (M-2393)	0'50
NaHCO <sub>3</sub> (S-5761)	25'00
<b>Medio de fecundación in vitro FIV-TALP suplementado</b>	
FIV-TALP-stock	-
BSA (A-6003)	0'60 % w/v
Piruvato sódico (P-2256)	0'20 mM
Heparina(H-3149)	1'75 UI/ml
Gentamicina(G1272)	50 µg/ml
Procaína	5 mM

### 5.5. Material biológico

El material biológico utilizado en este trabajo fue obtenido de animales sanos y cumpliendo en todo momento la normativa europea 86/609/CEE de protección,

experimentación animal, así como la normativa española sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. (RD 1201/2005, de 10 de octubre).

### **5.5.1. Obtención de los espermatozoides epididimarios**

Los epidídimos objeto de estudio procedieron tanto de animales sacrificados en el matadero (Orihuela, Alicante) como de castraciones realizadas por veterinarios clínicos colaboradores en diferentes puntos de la Región de Murcia. Los animales utilizados eran o bien de pura raza española (PRE) o bien mestizos, con edades comprendidas entre 18 meses y 15 años en los animales sacrificados en el matadero, mientras que los animales sometidos al proceso de castración tenían edades comprendidas entre 2-8 años.

Tras el sacrificio o castración de los animales, los epidídimos junto con los testículos fueron transportados en un recipiente isoterma al laboratorio en el plazo de una hora (Figura 5.1A), donde se procedió primeramente al lavado de las piezas y la separación de los testículos. Posteriormente se procedió al lavado de los epidídimos con SSF suplementada con antibiótico y se procedió a la disección de la cola de epidídimo. Seguidamente y para obtener los espermatozoides epididimarios se introdujo en el conducto deferente un catéter de inyección intravascular de poliuretano de 0'7 x 19 mm (Introcan® Certo, Braun, Alemania) acoplado a una jeringuilla de 5 ml cargada de aire. Posteriormente se realizó una ligera presión sobre el émbolo de la jeringuilla para impulsar con aire el fluido epididimario que fue recogido en un tubo colector (Figura 5.1C).

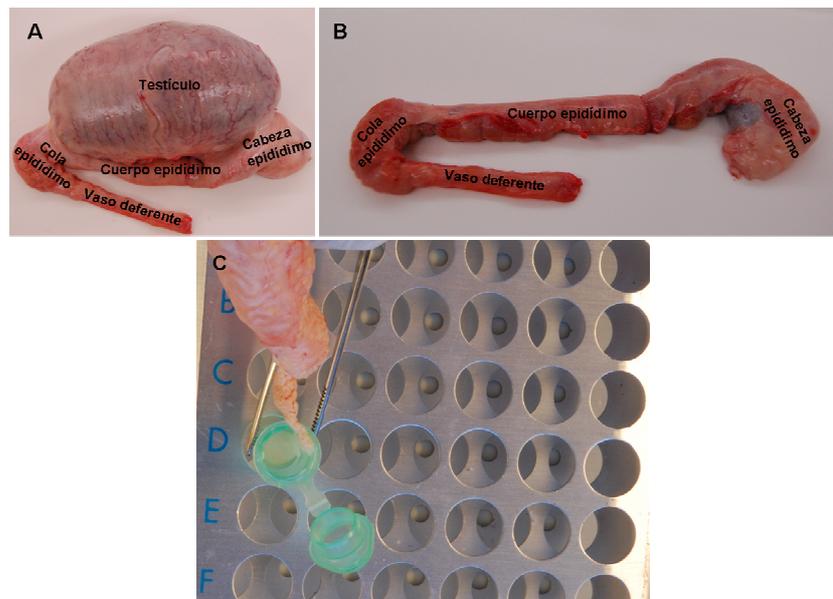
### **5.2.2. Obtención del plasma seminal**

El plasma seminal fue obtenido de sementales de pura raza española (PRE) de fertilidad probada y con edades comprendidas entre 6 y 17 años de edad. La obtención de semen se realizó mediante el empleo de una vagina artificial (modelo Missouri, Minitub Ibérica S.L., La Selva del Camp, Tarragona) con la ayuda de una yegua en celo. La temperatura interna de la vagina artificial se encontraba entre 40-45°C y en su extremo disponía de una camisa colectora con un filtro donde se depositó el semen.

Tras la obtención de los eyaculados se procedió a su transporte al laboratorio en un recipiente isoterma. Una vez allí, se realizó una primera centrifugación en tubos Falcón de 50 ml a 3000 g durante 30 minutos a 4°C. Seguidamente, se recogió el sobrenadante y se volvió a realizar una segunda centrifugación bajo las mismas condiciones. Finalmente, el plasma seminal obtenido se dispuso en tubos de 1 y 5 ml los cuales fueron congelados a -

20°C hasta el momento de su uso.

**Figura 5.1. A)** Testículo y epidídimo de caballo, **B)** Epidídimo de caballo disecado, donde se diferencian las tres porciones del epidídimo: cabeza cuerpo y cola **C)** Detalle del sistema de recogida de fluido epididimario



### 5.3. Técnicas utilizadas para la evaluación de la calidad espermática

Para evaluar la calidad de las muestras espermáticas se tuvieron en consideración los siguientes parámetros: volumen del fluido epididimario, concentración espermática, viabilidad espermática, fosforilación de tirosina, integridad del acrosoma, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), condensación de la cromatina y la capacidad fecundante mediante los sistemas de fecundación in vitro (FIV) e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

#### 5.3.1. Volumen del fluido epididimario

El fluido epididimario obtenido fue recogido en un tubo de microcentrífuga tipo eppendorf con capacidad máxima de 1500  $\mu\text{l}$ . Con la ayuda de una micropipeta se valoró el volumen de la muestra obtenida en unidades de 100  $\mu\text{l}$ . Los valores de volumen se expresan en  $\mu\text{l}$ .

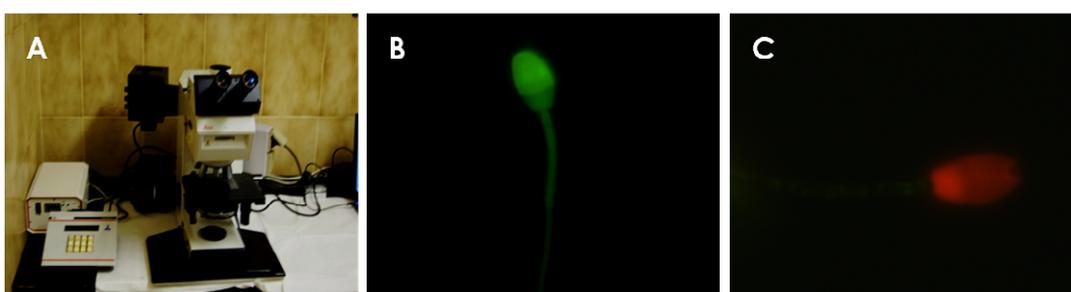
### 5.3.2. Concentración espermática

La concentración espermática fue evaluada mediante el empleo de una cámara de recuento celular de Neubauer (VWR Internacional, Haasrode, Bélgica). Se preparó una dilución 1/1000 del fluido epididimario en una solución salina formolada al 0'3%. Los valores de concentración espermática se expresan en  $10^9$  espermatozoides/ml.

### 5.3.3. Viabilidad espermática

La viabilidad de los espermatozoides se determinó siguiendo el protocolo descrito por (Harrison and Vickers, 1990), mediante la incubación en una solución que contenía 20  $\mu$ l de diacetato de carboxifluoresceína (CFD, 0'46mg/ml), 20  $\mu$ l de yoduro de propídio (IP, 500  $\mu$ g/ml), 10  $\mu$ l de la solución salina formolada al 0'3%, y 950  $\mu$ l de la solución salina fisiológica. A esta solución de tinción se le adicionó las muestras espermáticas (1  $\mu$ l de muestra fresca o 100  $\mu$ l de muestra diluida) para tener una concentración final 1-10 x  $10^6$  espermatozoides/ml. Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente y en la oscuridad, se observaron un total de 200 células espermáticas en un microscopio de epifluorescencia (Leica® DMLS, x400 aumentos). Los espermatozoides se clasificaron de acuerdo a la fluorescencia observada en dos grupos: **1)** células con fluorescencia verde indicador de la integridad de la membrana espermática y **2)** células con fluorescencia roja indicador de la alteración de la membrana espermática (Figura 5.2).

**Figura 5.2.** **A)** Microscopio de fluorescencia Leica® DMLS, **B)** espermatozoide con la membrana intacta y **C)** espermatozoide con la membrana alterada



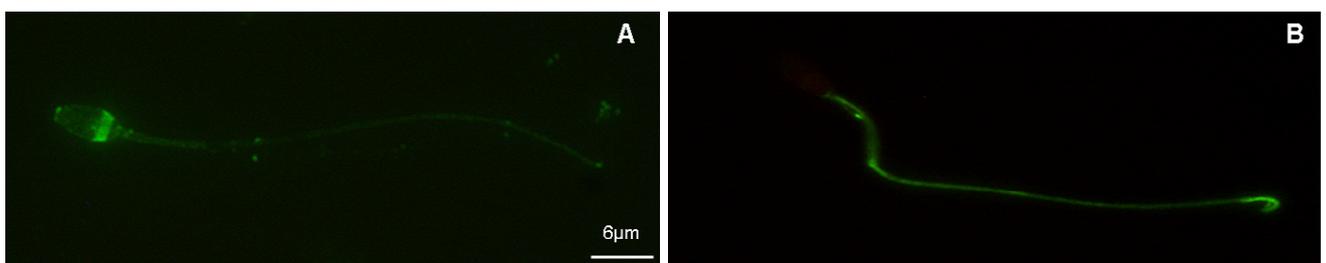
#### 5.3.4. Análisis de la fosforilación de tirosina de proteínas

Para determinar la localización de las proteínas espermáticas fosforiladas en tirosina se utilizó una técnica de inmunofluorescencia indirecta siguiendo el protocolo previamente descrito (Matas et al., 2011).

Las muestras espermáticas se centrifugaron a 700 g durante 3 minutos y el pellet se fijó con 500 µl de la solución salina con formaldehído al 2% durante 1 hora a 4 °C. Pasado este tiempo, las muestras se centrifugaron de nuevo a 270 g durante 10 minutos a 4 °C y fueron resuspendidos en una solución de bloqueo de PBS con el 4% BSA (w/v) y mantenidos durante toda la noche a 4 °C. El día siguiente se centrifugaron nuevamente y el pellet resultante se resuspendió en PBS. Seguidamente se realizaron extensiones sobre los portaobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se incubaron durante 1 hora a 4°C con el anticuerpo primario monoclonal anti-fosfotirosina (4G10, Millipore, Madrid, España) diluido 1:300. Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Fluoresceína (FITC) "goat anti-mouse IgG (H+L)" (Upstate Millipore, Temecula; CA, EEUU) diluido 1:400. Finalmente, se lavaron los portaobjetos con PBS y se montaron con el medio de montaje (Dako® CA, EEUU) para su posterior análisis con un microscopio de epifluorescencia (Leica® DMR) con el objetivo 100X.

Los controles negativos se prepararon mediante la incubación de las muestras espermáticas únicamente con el anticuerpo secundario. Se observaron un total de 200 espermatozoides por muestra y se clasificaron de acuerdo a la localización de la señal fluorescente en la región sub-ecuatorial o en la región de la cola del espermatozoide (Pommer et al., 2003) (Figura 5.3).

**Figura 5.3.** Imagen del microscopio de fluorescencia donde se puede observar fosforilación de tirosina en dos regiones del espermatozoide: **A)** sub-ecuatorial y **B)** cola



### **5.3.5. Evaluación de la calidad espermática mediante citometría de flujo**

El análisis de los espermatozoides mediante citometría de flujo se realizó con un equipo Coulter Epics XL cytometer (Beckman Coulter Inc., S.A., Miami, Florida, EE.UU) que dispone de un láser de argón de 15 mW y excita los fluorocromos a una longitud de onda de 488 nm. Para cada análisis se hicieron cuatro mediciones por muestra y los datos resultantes fueron analizados usando el programa Expo32ADC (Beckman Coulter la S.A).

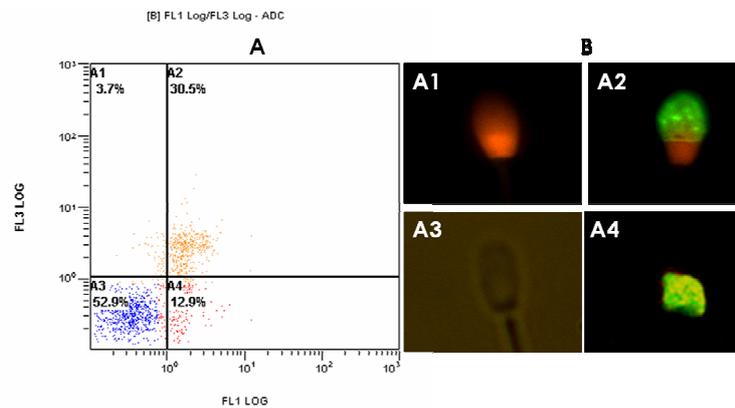
De todos los datos presentes se seleccionó una zona (gate) de acuerdo al tamaño de partícula (forward scatter FS) y la complejidad de la superficie de las partículas (side scatter SS) para eliminar restos (debris) o agregados celulares que pueden distorsionar el análisis. La citometría de flujo se utilizó para evaluar los parámetros de viabilidad espermática, la integridad acrosomal, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el estado de condensación de la cromatina siguiendo los protocolos establecidos en los laboratorios del grupo de Fisiología de la Reproducción de la Universidad de Murcia (Gadea et al., 2005; Gadea et al., 2008; Gadea et al., 2011).

#### **5.3.5.1 Integridad del acrosoma**

Para evaluar simultáneamente la viabilidad de los espermatozoides y el estado del acrosoma utilizamos el marcador de viabilidad fluorescente Ioduro de Propidio (IP) y la lectina Peanut Agglutinin (PNA) marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC, 6 mg FITC/mol de PNA) respectivamente. La lectina PNA presenta afinidad por el contenido acrosomal, de manera que si la membrana acrosomal se encuentra alterada o rota va a detectarse una señal de fluorescencia verde.

Se incubó un volumen de 1 ml de la suspensión con los espermatozoides ( $1-10 \times 10^6$  células/ml) con 10  $\mu$ l de la lectina PNA-FITC (100  $\mu$ g/ml) y 5  $\mu$ l de la solución stock de IP (500  $\mu$ g/ml) durante 10 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz. En el citómetro de flujo se midió la fluorescencia emitida por las células espermáticas mediante el sensor FL-1 a 525 nm para la detección de FITC-PNA y el sensor FL-2 a 575 nm para la detección de IP. Se determinaron cuatro subpoblaciones espermáticas: viables con acrosoma intacto, viables con acrosoma alterado, muertos con acrosoma intacto y muertos con acrosoma alterado (Figura 5.4).

**Figura 5.4. A)** Imagen tomada del citómetro de flujo durante el análisis del estado acrosomal en la que se muestra la distribución de las poblaciones espermáticas. **B:** Imagen obtenida mediante microscopia de fluorescencia de las poblaciones espermáticas correspondientes a las evaluadas mediante citometría de flujo. **A1)** Espermatozoides muertos con arosoma intacto, **A2)** muertos con acrosoma alterado **A3)** viables con acrosoma intacto y **A4)** viables con acrosoma alterado

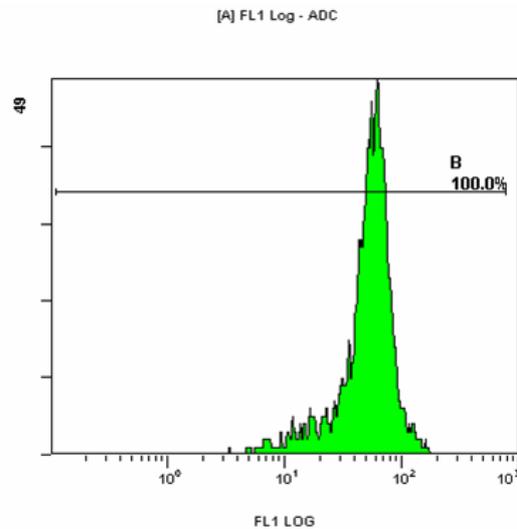


### 5.3.5.2. Medición de especies reactivas de oxígeno (ROS)

La evaluación de la producción de ROS se realizó mediante la incubación de los espermatozoides en presencia de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA) siguiendo el protocolo descrito previamente (Gadea et al., 2008). El H<sub>2</sub>DCFDA es un compuesto orgánico no fluorescente y permeable a la membrana celular que en presencia de esterasas y de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y mediante un proceso combinado de hidrólisis y oxidación se convierte en diclorofluoresceína (DCF), sustancia altamente fluorescente con espectros de absorción y emisión de 490 nm y 529 nm, respectivamente.

Para medir la generación de ROS, a 1 ml de la muestra con una concentración de 1-10 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml, se le añadieron 5 µl de la solución stock del H<sub>2</sub>DCFDA (concentración final 5 µM). Transcurridos 15 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz se procedió a su medición en el citómetro de flujo. La fluorescencia verde fue recogida con el sensor FL1 usando un filtro de banda de 525 nm. Las medidas fueron expresadas como unidades de intensidad de fluorescencia verde, siendo usado como indicador de generación de ROS (Figura 5.5).

**Figura 5.5.** Imagen de citometría de flujo tomada durante el análisis de la generación de ROS

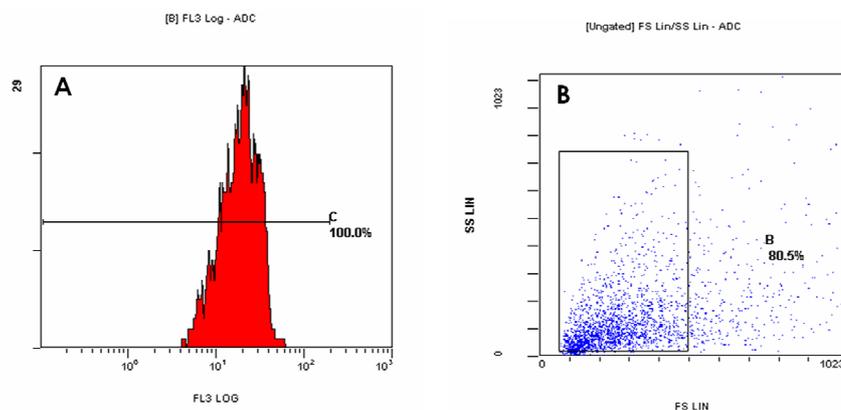


### 5.3.5.3. Determinación de la condensación de la cromatina

El grado de condensación de la cromatina de los espermatozoides se determinó mediante la tinción con yoduro de propidio, midiendo la captación de yoduro de propidio por parte del ADN del espermatozoide (Molina et al., 1995; Gadea et al., 2008). La intensidad de la señal fluorescente roja está relacionada de manera inversa con el grado de condensación de la cromatina. De manera que a mayor condensación de cromatina menos posibilidad de captación de IP y en consecuencia menor señal de fluorescencia roja (Gadea et al., 2011).

Las muestras espermáticas con una concentración de  $1-5 \times 10^6$  células/ml se incubaron con 1 ml de una solución de etanol en solución salina fisiológica (70% v/v) durante 30 minutos a 4 °C para producir la permeabilización de la membrana plasmática. Posteriormente se conservaron a -80 °C hasta el momento de su uso. Para el análisis del estado de condensación de la cromatina, las muestras descongeladas a temperatura ambiente, se lavaron con solución salina fisiológica mediante centrifugación a 600 g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con una solución de yoduro de propidio en PBS (concentración final 0'5 mg/ml). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente en ausencia de luz durante 1 hora antes de ser analizadas en citometría de flujo. La fluorescencia se recogió mediante el sensor FL3 con el filtro de banda de 650 nm y se expresó en forma de unidades de intensidad de fluorescencia media (Figura 5.6).

**Figura 5.6.** Imágenes de citometría de flujo obtenidas durante el análisis de la condensación de la cromatina. **A)** Fluorescencia roja correspondiente a la tinción con IP detectada con el sensor FL3 a 650 nm, **B)** detalle de la población de espermatozoides analizada



### 5.3.6. Evaluación de la capacidad fecundante mediante técnicas de fecundación *in vitro* (FIV e ICSI en sistemas heterólogos)

La capacidad de penetración y formación de pronúcleos de los espermatozoides equinos fue evaluada mediante un sistema heterólogo de FIV con ovocitos bovinos libres de zona pelúcida y un sistema ICSI con ovocitos bovinos con zona.

#### 5.3.6.1. Obtención de ovocitos bovinos y maduración *in vitro*

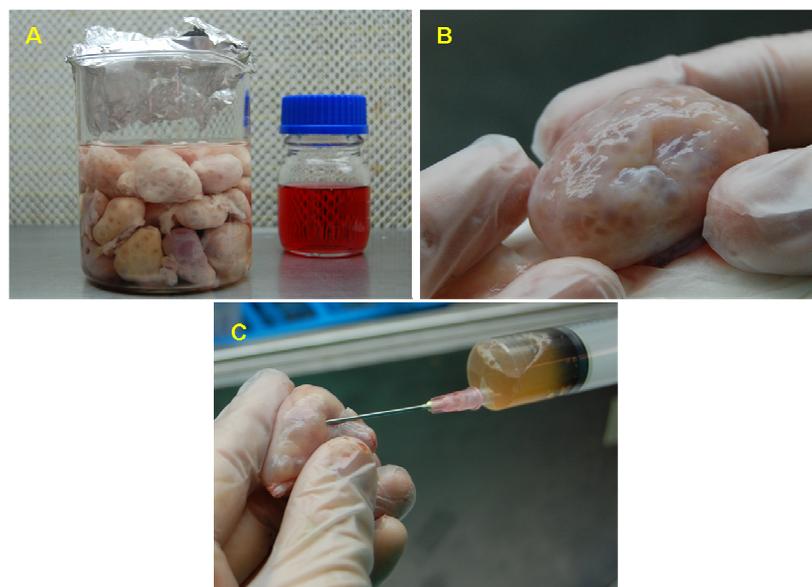
##### **Obtención de ovocitos**

Los ovocitos procedían de ovarios de hembras bovinas de razas de aptitud cárnica (Asturiana, Charolesa, Limusina, Simmental-Fleckvieh y animales mestizos) con edades comprendidas entre los 10 y 14 meses y un peso vivo aproximado de 450 Kg. Estos animales fueron sacrificados en un matadero situado a 30 km de nuestro laboratorio (Orihuela, Alicante). El transporte de las muestras se realizó en un recipiente isoterma con solución salina a 38-38'5°C en el plazo aproximado de 1 h desde el sacrificio de los animales.

En el laboratorio, se lavaron los ovarios varias veces con solución salina fisiológica suplementado con kanamicina, se seleccionaron los ovarios con buen desarrollo folicular y

se mantuvieron en un vaso de precipitado con solución salina sobre placa calefactora a 38'5°C hasta el momento de la obtención de los ovocitos (Figura 5.7A).

**Figura 5.7.** Imagen de la obtención de ovocitos procedentes de folículos ováricos de vacas sacrificadas en matadero. **A)** Imagen de un vaso de precipitado con ovarios y medio de obtención, **B)** Ovario bovino con numerosos folículos, y **C)** Procedimiento aplicado para la obtención de los ovocito

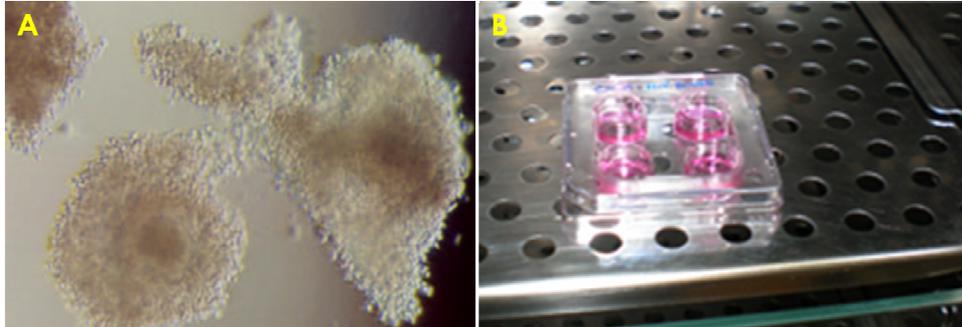


Los complejos cúmulo-ovocito (COCs) fueron recogidos por aspiración de los folículos de diámetro entre 2 y 6 mm, mediante el uso de una aguja de 18 G acoplada en una jeringuilla de 20 ml (Figura 5.7C). El contenido folicular fue depositado en placas de Petri de 35 mm Ø dispuestas sobre una placa calefactora a 38'5°C.

#### **Maduración in vitro de ovocitos**

Para la maduración in vitro se seleccionaron bajo el estereomicroscopio (Nikon® SMZ-10<sup>o</sup>, Tokyo, Japón) aquellos ovocitos que presentaban varias capas de células de cumulus oophorus y un citoplasma granulado, homogéneo y de aspecto compacto (Figura 5.8A).

**Figura 5.8. A)** Imagen de complejos cúmulo-ovocito "COCs" inmaduros y **B)** Imagen del sistema de maduración de los COCs



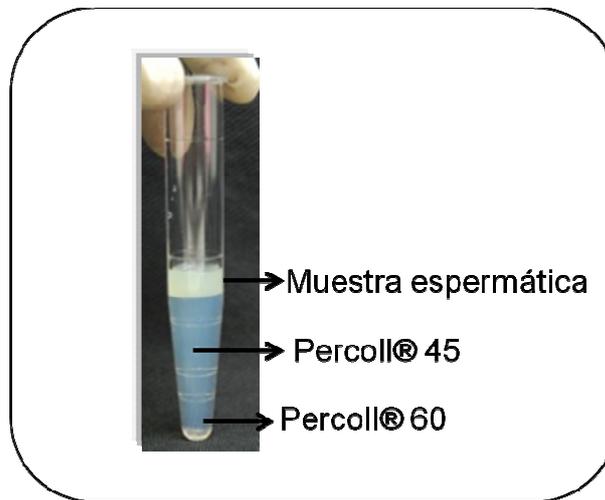
La maduración *in vitro* se realizó siguiendo el protocolo descrito previamente por (Coy et al., 2008). Los COC seleccionados fueron lavados una vez en PBS atemperado y posteriormente dos veces en medio maduración que previamente había sido equilibrado en el incubador a 38'5°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante aproximadamente 2 h. Posteriormente los ovocitos, en grupos de 30-40, fueron cultivados durante un período de 22-24 h en un incubador a 38'5°C con atmósfera saturada de humedad y con 5% de CO<sub>2</sub>, dispuestos en placas de cuatro pocillos (Nunc # 176740) con un volumen de 500 µl de medio de maduración (Figura 5.8B).

#### **5.3.6.2. Preparación de los espermatozoides de epidídimo de caballo para ICSI y FIV**

Los espermatozoides equinos fueron sometidos a un sistema de selección mediante la centrifugación en un gradiente de densidad de Percoll de dos bandas 45/60. Para ello un volumen de 0'5 ml de la muestra espermática descongelada fue depositada sobre una columna de Percoll® de doble banda, constituida por 2 ml de la solución de Percoll® 45%, que a su vez se depositaba sobre 2 ml de la solución de Percoll® 60% (Figura 5.9).

Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 700 g durante 20 minutos a temperatura ambiente y el pellet obtenido fue resuspendido en medio sperm-TALP. Se centrifugó de nuevo a 700 g durante 5 min para resuspender finalmente el pellet en 500 µl de FIV-TALP que contenía 5 mM de procaína (McPartlin et al., 2009). La concentración final se ajustó a 2x10<sup>5</sup> spz/ml y se incubó durante 15 min a 38'5°C en atmósfera saturada de humedad y con 5% de CO<sub>2</sub> antes de realizar el proceso de fecundación *in vitro* (FIV o ICSI).

**Figura 5.9.** Gradiente de Percoll® para la preparación de los espermatozoides para su posterior uso en FIV e ICSI



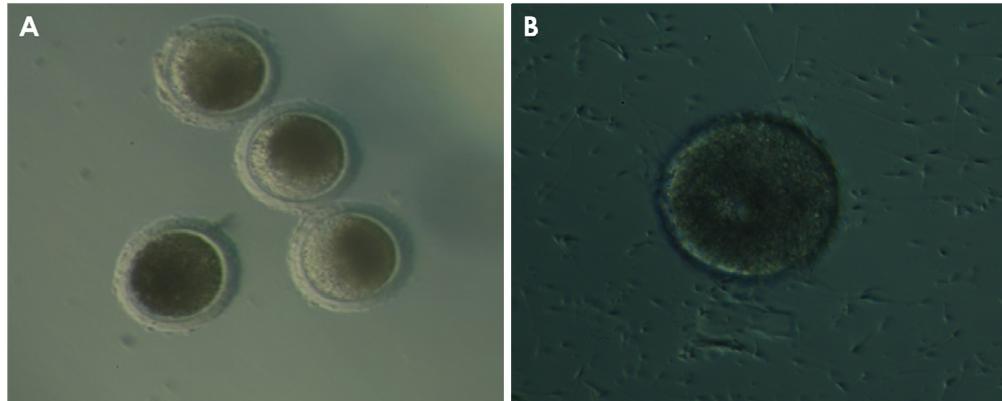
#### 5.3.6.3. Fecundación *in vitro*

Tras la maduración de los ovocitos, éstos se lavaron en PBS y fueron decumulados mecánicamente a través de sucesivos pases con una pipeta automática (Figura 5.10A). Seguidamente se eliminó la zona pelúcida (ZP) mediante digestión con la enzima pronasa al 0'3 %.

Los ovocitos libres de zona pelúcida, en grupos de 30-35, fueron depositados en los pocillos de las placas de FIV con un volumen de 250 µl de medio FIV-TALP, que previamente había sido equilibrado al menos durante 3 horas en el incubador en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Las placas con los ovocitos fueron introducidas en el incubador a la espera de concluir el procesado de los espermatozoides. A cada pocillo que contenía los ovocitos se le adicionó un volumen de 250 µl de la suspensión de espermatozoides seleccionados, siendo la concentración espermática final de 1x10<sup>5</sup> células/ml de medio de FIV (Figura 5.10B).

Transcurridas 18-20 h de cocultivo, los ovocitos se lavaron en PBS a 37°C, para eliminar el exceso de espermatozoides adheridos y posteriormente fueron fijados para proceder a su evaluación tal y como se describe posteriormente en el apartado 5.4.

**Figura 5.10. A)** Imagen de ovocitos madurados y decumulados, **B)** Imagen de ovocito sin zona pelúcida tras ser incubado con espermatozoides

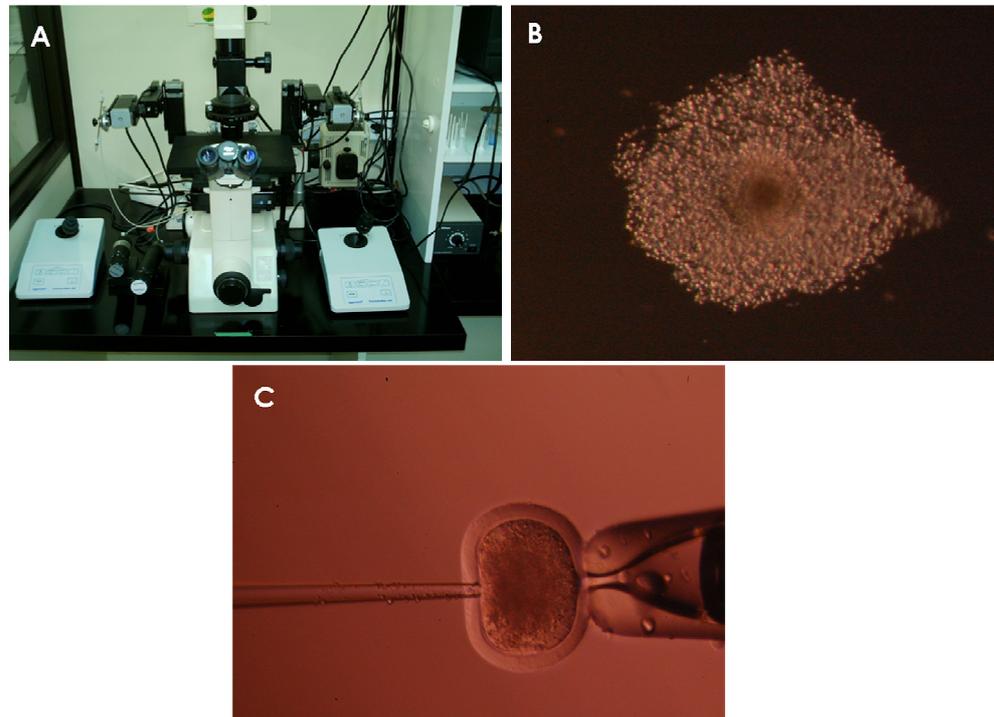


#### 5.3.6.4. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

La inyección intracitoplasmática de espermatozoide se realizó según el protocolo descrito previamente por (García-Vázquez et al., 2010). Todo el procedimiento se realizó a 38'5°C en un microscopio invertido Nikon® Diaphot 300 con micromanipuladores TransferMan® NK (Eppendorf®) y con el microinyector CellTram Air/CellTram Oil (Eppendorf®) (Figura 5.11A).

Primeramente, se dispusieron 3 gotas de 4 µl de PBS suplementado con 10% de suero fetal bovino en el centro de la placa (Falcon® petri dish 50 x 9 mm). A estas gotas se le adicionó 1 µl de la suspensión de espermatozoides seleccionados. Alrededor de estas gotas colocadas en el centro de la placa, se dispusieron 12 microgotas de 4 µl de PBS suplementado con un ovocito en cada una de las gotas (Figura 5.11B). Se cubrieron con aceite mineral (embryo tested, M-8410-1L, Sigma) para evitar su evaporación. Se procedió entonces a inyectar un espermatozoide dentro del ooplasma de cada ovocito decumulado (Figura 5.11C). Para ello se inmovilizó al espermatozoide y a continuación se aspiró desde la cola quedando su cabeza más cerca de la entrada de la pipeta. Una vez capturado el espermatozoide, el ovocito se fijó con la pipeta (Eppendorf® Sterile VacuTips). Asegurando antes de la inyección que el corpúsculo polar estuviera en posición de 6 o 12 horas. Después de la inyección los ovocitos se lavaron en el medio FIV-TALP y se incubaron a 38'5°C, 5% CO<sub>2</sub> y 100% de humedad durante 18- 20 horas. Posteriormente fueron fijados para proceder a su evaluación tal y como se describe en el apartado 5.4.

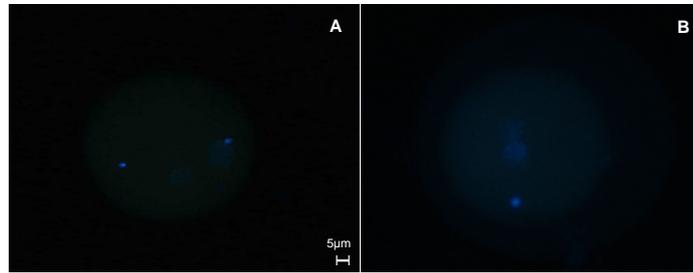
**Figura 5.11. A)** Imagen de microscopio invertido Nikon® Diaphot 300, **B)** Imagen de un ovocito maduro con células de cúmulos expandidas y **C)** Inyección intracitoplasmática de espermatozoide con pipeta de sujeción y pipeta de inyección



#### **5.4. Evaluación de FIV e ICSI mediante microscopio de fluorescencia**

Los ovocitos procedentes de FIV e ICSI se fijaron con una solución de glutaraldehído (Sigma G-5882) al 0'5% en solución salina durante 30 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se lavaron en PBS y se tiñeron con 300  $\mu$ l de Hoechst® 33342 al 1% durante 15 min, tras un lavado adicional y se le añadió el medio de montaje. Por último, se procedió a su evaluación en el microscopio de fluorescencia (Leica® DMR) usando un filtro UV de 495 nm de longitud de onda con los objetivos de 20X, 40X. Se valoró la presencia de espermatozoides en el interior del citoplasma del ovocitos y la formación de pronúcleos (Figura 5.12).

**Figura 5.12.** Imagen tomada mediante microscopia de fluorescencia de ovocitos fecundados teñidos con Hoechst. **A)** Formación de 2 pronúcleos procedente de ICSI (ovocito con ZP), **B)** Formación de 2 pronúcleos procedente de FIV (ovocito libre de ZP)



### 5.5. Congelación espermática

En el proceso de la congelación de los espermatozoides epididimarios podemos distinguir básicamente tres fases:

- 1) Dilución, enfriamiento y estabilización de los espermatozoides en el medio de congelación durante 30 min a 4°C.
- 2) Envasado.
- 3) Congelación propiamente dicha.

#### 5.5.1. Fase de enfriamiento, dilución, y estabilización (4°C)

Como hemos mencionado anteriormente, las muestras de epidídimo recuperadas se depositaron directamente en la cámara frigorífica (Figura 5.13) a una temperatura de 4°C y mantenidas durante un periodo de tiempo de 60 min. Igualmente todos los materiales que se utilizaron durante todo el procedimiento (pajuelas, gradillas, alcohol polivinilo, pinzas, papeles de secado, agua etc.) se acondicionaron a 4°C antes de su uso.

Después de este tiempo, la muestra espermática fue diluida lentamente con el medio de congelación antes descrito a la misma temperatura hasta alcanzar una concentración final de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/ml, manteniéndose en estas condiciones durante 30 min.

**Figura 5.13.** Imagen de la cámara frigorífica a 4°C donde se desarrolló el procesado y manipulación de los espermatozoides para su enfriamiento



### **5.5.2. Envasado**

Una vez estabilizadas las muestras en el medio de congelación se cargaron manualmente las pajuelas de PVC de 0'5 ml (IMV, L'Aigle, Francia). El extremo libre de la pajuela fue sellado con alcohol de polivinilo y se depositaron sobre una gradilla metálica (Cochran et al., 1984). Todas las pajuelas estaban rotuladas adecuadamente con un código para su posterior identificación (fecha de congelación, tiempo de conservación de epidídimos a 4°C, animal de procedencia, etc...).

### **5.5.3. Congelación espermática**

La congelación se llevó a cabo exponiendo las pajuelas a los vapores de nitrógeno líquido siguiendo el protocolo descrito por (Cochran et al., 1984). Para lo cual se empleó una caja de poliestireno expandido (29 cm de alto, 23 cm de largo y 6 cm de grosor). Las pajuelas envasadas se dispusieron durante 15 min en posición horizontal sobre una malla metálica situada a 4 cm por encima del nitrógeno líquido. Una vez transcurrido este tiempo, las pajuelas fueron sumergidas directamente en el nitrógeno líquido y guardado en un tanque debidamente identificado para su almacenamiento.

## **5.6. Descongelación**

La descongelación se llevó a cabo según el método descrito por (Vidament et al., 2001). Para ello, las pajuelas de 0'5 ml se depositaron en baño térmico a 37°C durante 30 segundos. Posteriormente se retiraron del baño, se secaron y se cortaron ambos extremos depositando el contenido de la pajuela en un tubo de ensayo para su posterior análisis.

## **5.7. Determinación de la capacidad antioxidante, composición de los ácidos grasos y proteínas del plasma seminal**

### **5.7.1. Capacidad antioxidante total del plasma seminal**

El estudio de la capacidad antioxidante total del plasma seminal se llevó a cabo en el Centro de Edafología y Biología Aplicada (CEBAS), por miembros del Grupo de Estrés Abiótico, Producción y Calidad.

Para determinar el nivel de antioxidante total del plasma seminal se utilizó el método basado en ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenziazoline-6-sulphonic acid)(Miller et al., 1993). El ABTS es un sustrato de la enzima peroxidasa que produce un producto final soluble de color verde que se puede medir por espectrofotometría a una longitud de onda de 405 nm.

Se utilizó una solución de 0'1mM de ABTS, 0'04 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en tampón de glicina-HCl a un pH 4'5. Posteriormente se le adicionó 0'25 µM de peroxidasa de rábano (HRP-HorseRadish Peroxidase) para iniciar la reacción que lleva a la formación de radicales de ABTS. Seguidamente se le añadió la muestra de plasma seminal con lo cual hubo un descenso de la absorbancia. El resultado obtenido en la diferencia entre estos dos valores de absorbancia fueron comparados con una curva de calibrado que se realizó utilizando ácido ascórbico (0 µl buffer, 5 µl, 10 µl, 15 µl y 20 µl de una solución de ácido ascórbico 1mM en agua MilliQ en nmol/µl), cuyos valores se transformaron en equivalentes en actividad antioxidante al ácido L-ascórbico en nmol/ml.

### **5.7.2. Composición en ácidos grasos del plasma seminal**

El estudio de la composición de los ácidos grasos se realizó en el departamento de Fisiología de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia.

Los lípidos totales fueron extraídos del plasma seminal mediante la homogenización en 20 ml de cloroformo/metanol (2:1 v/v) utilizando un Ultra Turrax (IKA ULTRA-TURRAX T 25 digital, IKA-WERKE). Los lípidos totales se obtuvieron según el método descrito por (Folch et al., 1957). Las impurezas y los compuestos no lipídicos se eliminaron mediante lavado con 0'88 % (w/v) KCl y el peso se determinó por gravimetría. Esta se hizo una vez finalizada la evaporación del disolvente y desecación durante toda la noche bajo atmosfera de nitrógeno.

Tras la extracción de los lípidos se procedió a la transmetilación de los mismos según el método descrito por (Christie and Han, 2010). Para ello, a la muestra se le adicionó 2 ml de ácido sulfúrico al 1 % en metanol y 1 ml de tolueno para disolver los lípidos neutros y se dejó incubar durante toda la noche (máximo 18 horas) a 50°C.

Los ácidos grasos fueron extraídos dos veces en 5 ml de hexano/dietil éter (1:1 v/v) después de la neutralización con 2 ml de KHCO<sub>3</sub> al 2%, concentrados bajo atmósfera inerte de nitrógeno y disueltos nuevamente en 1 ml de iso-hexano. Por último se procedió a la separación y cuantificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos mediante cromatografía gas-líquido utilizando una columna capilar flexible de silicona SPTM 2560 de 100 m de longitud con un diámetro interno de 0'25 mm y un grosor de 0'20 µm en un cromatógrafo gas-líquido Hewlett-Packard 5890.

El programa de temperatura empleado en los análisis fue el siguiente: una temperatura inicial de 140°C se incrementó a 230°C a una velocidad de 4°C/min, luego se volvió a aumentar hasta alcanzar 240°C a una velocidad de 1°C/min y se mantuvo a esa temperatura durante 6 minutos, volviendo posteriormente a la temperatura inicial a una velocidad de 10°C/min.

El inyector y detector de ionización de llama se establecieron a 250°C. Se utilizó helio como gas portador con una presión de 290 KPa y los picos se identificaron mediante la comparación de sus tiempos de retención con los estándares apropiados de ésteres metílicos de ácidos grasos (Sigma). Las concentraciones individuales de ácidos grasos se expresaron como porcentaje total del contenido de lípidos.

### **5.7.3. Análisis de la composición proteica del plasma seminal**

Para analizar las proteínas del plasma seminal se utilizaron diferentes técnicas con el objetivo de identificar y estudiar las proteínas que pudiesen ejercer algunas funciones sobre los espermatozoides epididimarios.

### 5.7.3.1. Concentración de proteínas

Para la cuantificación de la concentración de proteínas totales del plasma seminal de caballo se utilizó el Kit BCA de Bio-Rad (CA, EE.UU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Primeramente se depositaron 5  $\mu$ l del plasma seminal en los tubos eppendorf correspondientes y se le adicionaron 45  $\mu$ l de agua milliQ, a esta cantidad se le agregó 950  $\mu$ l de la mezcla del Mix A y B. Las muestras se mantuvieron a 37°C durante 30 min. Pasado este tiempo se procedió a la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro (Biotek Power Wave xs Instruments, Inc., EE.UU) a una longitud de onda de 562 nm.

Se determinó la curva de calibrado usando la albúmina como patrón. Se utilizó el programa GraphPad PRISM 4 para la cuantificación de la proteína usando como referencia los datos de absorbancia obtenido de la curva patrón. La cuantificación de la proteína se realizó por duplicado.

### 5.7.3.2. Electroforesis en gel en una dimensión

Una vez conocida la concentración proteica del plasma seminal de las muestras, se procedió a la separación de las mismas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Las muestras con una concentración ajustada a 15  $\mu$ g/ $\mu$ l se diluyeron en el tampón de carga Laemmli 1:1% v/v (tabla 5.9) con volumen máximo de 30  $\mu$ l (Laemmli, 1970).

**Tabla 5.9.** Composición del tampón desnaturizante (Laemmli, 1970)

Componentes	Concentración
Tris HCl (pH 6'8)	0'2 M
Glicerol v/v	10%
Dodecil sulfato sódico SDS	4%
Azul de bromofenol	0'01%
2 $\beta$ -mercaptoetanol	5%
DTT (ditiotreitól)	0'2 M

Posteriormente se procedió a desnaturalizar las proteínas, para lo cual se calentaron a 95°C durante 5 min en un termobloque (Biosan CH-100, Biogen Letonia).

Las proteínas se separaron en los geles discontinuos de poliacrilamida, la primera fase en el gel concentrador de poliacrilamida al 4% (pH 6'8) (Tabla 5.10) y la segunda fase en un gel separador al 12% y/o al 15% de poliacrilamida (pH 8'8) (Tabla 5.11). La electroforesis se realizó a temperatura ambiente en periodo de una hora y veinte minutos en tampón de recorrido (tabla 5.12), sometido a un campo eléctrico con un voltaje constante de 90 mv para el gel concentrador y 200 mv para el gel separador.

Se utilizaron geles de acrilamida de dos concentraciones (12% y 15%) para analizar la distribución de las proteínas presentes en el plasma seminal de los machos utilizado en nuestro trabajo, ya que el gel de acrilamida del 12% separa mejor las proteínas de mayor peso molecular, mientras que el gel del 15% ofrece una mejor separación de las proteínas de bajo peso molecular.

**Tabla 5.10.** Composición del gel concentrador de poliacrilamida al 4% (5 ml)

Componentes	Volumen
Agua destilada	3'05 ml
Tris-HCL 1'5 M. pH6'5 (154563)	1'25 ml
SDS al 10% (p/v) (L-4522)	50 µl
Acrilamida-Bisacrilamida al 30% (A-3449)	0'65 ml
Persulfato amónico 10% (Biorad, 161-0700)	25 µl
Temed (T-9281)	5 µl

En una de las calles del gel se cargó el marcador molecular (Precision Plus Protein Standards Dual Color de Bio-Rad CA, EE.UU) con un peso molecular que oscila entre 10-250 kDa.

**Tabla 5.11.** Composición del gel separador 12 y 15% de poliacrilamida

Componentes	12% Volumen	15%
Agua destilada	3'4 ml	2'3 ml
Tris-HCL 1'5 M. pH 8'8 (154563)	2'5 ml	2'5 ml
SDS al 10% (p/v) (L-4522)	100 µl	100 µl
Acrilamida-Bisacrilamida al 30% (A-3449)	3'96 ml	5'0 ml
Persulfato amónico 10% (Biorad, 161-0700)	50 µl	50 µl
Temed (T-9281)	10 µl	10 µl

**Tabla 5.12.** Composición del tampón de recorrido

Componentes	Concentración
Agua destilada	1 L
Tris-Base (154563)	0'025 M
Glicina (G-8898)	0'192 M
SDS (L-3761)	0'1% p/v
pH 8'3	-

### 5.7.3.2.1. Tinción de plata

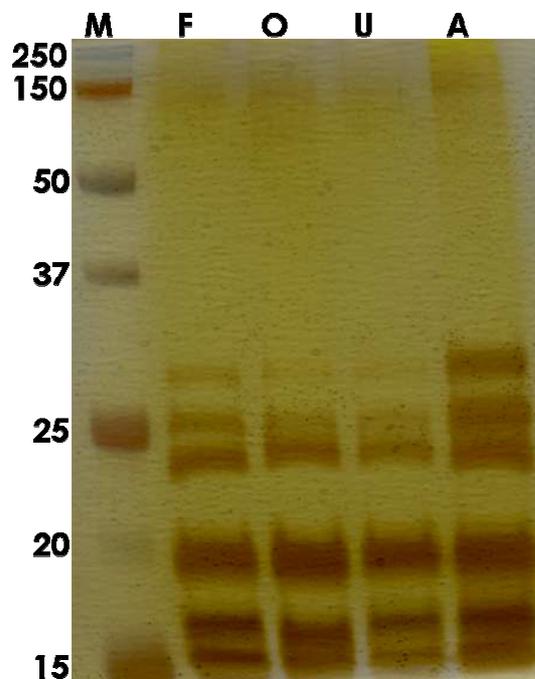
Una vez finalizado la electroforesis los geles se fijaron durante 30 min en la solución de ácido acético-metanol 1:10 (v/v) y posteriormente se hizo un primer lavado de 15 min en una solución de metanol al 50% en agua ultrapura y un segundo lavado de 15 min únicamente con agua ultrapura.

Después se sensibilizaron los geles durante 1 min con la solución tiosulfato sódico al 0'01% (Fluka, 96692). Luego se hicieron dos lavados de 1 min cada uno con el agua

ultrapura y se colocaron en una solución de nitrato de plata al 0'1% (Fluka, 85228) en agua ultrapura durante 20 min a 4°C. A continuación se volvieron a lavar dos veces durante 1 min cada uno con agua ultrapura.

El revelado se hizo con la solución de carbonato sódico al 2% (Fluka, 71345), en formol al 35% (Fluka, 47630) con la placa en constante agitación. Una vez que aparecieron las bandas la reacción se detuvo con la solución de ácido acético al 5% durante 5 min. Posteriormente los geles se conservaron en una solución de ácido acético al 1% en agua ultrapura a 4°C (Figura 5.14).

**Figura 5.14.** Imagen del gel teñido mediante la tinción de plata



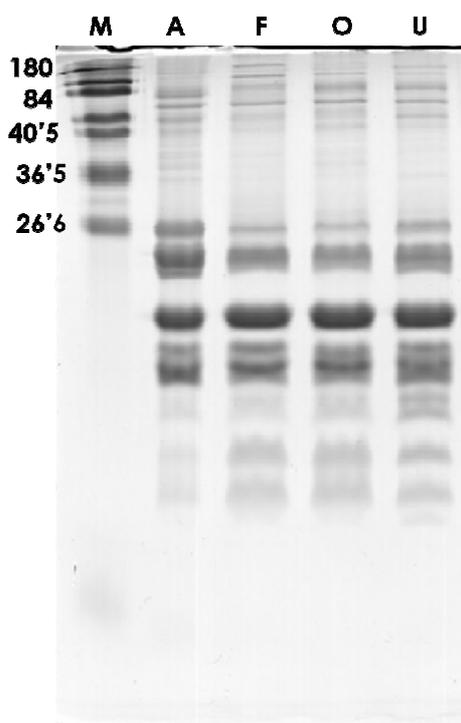
### 5.7.3.2.2. Tinción de azul de Coomassie

Después de la electroforesis, el gel se sumergió en la solución de azul de Coomassie (tabla 5.13) durante una hora en constante agitación. Pasado este tiempo, para desteñir el gel e identificar las bandas, se introdujo en una solución de etanol al 40% y ácido acético al 10% en agua ultrapura durante 30 minutos. Una vez que se visualizaron las bandas, se eliminó esta solución y el gel se lavó con agua ultrapura (Figura 5.15).

**Tabla 5.13.** Composición de la tinción de azul de Coomassie

Componentes	Concentración
Azul de Coomassie G-250	0'1%
Etanol	40%
Ácido acético	10%
Agua mili-Q	50 ml

**Figura 5.15.** Imagen del gel teñido mediante la tinción de azul de Coomassie



### **5.7.3.2.3. Análisis proteico mediante electroforesis capilar**

Además de las determinaciones proteicas por los métodos anteriormente detallados, las muestras también se sometieron a una electroforesis capilar utilizando el equipo Bioanalyzer 2100 de Agilent Technologies con el chip Agilent 230 kit en la Sección de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia.

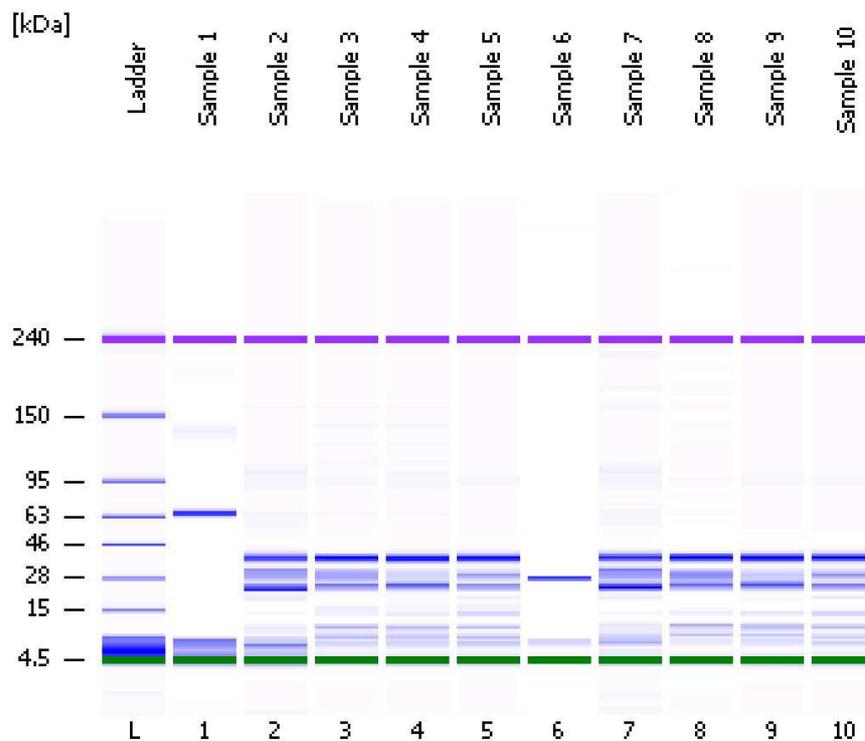
Este equipo supone una plataforma basada en la tecnología de microfluidos para poder determinar el tamaño, la concentración, pureza y calidad de moléculas biológicas de interés, como ADN, ARN y proteínas. Los resultados se obtienen en un intervalo de tiempo relativamente corto (30-40 minutos) y con gran calidad. Este equipo aparece como una alternativa a la técnica de electroforesis en gel (SDS-PAGE), eliminando los pasos de preparación de los geles, tinción y adquisición de imágenes.

Para realizar el análisis, las muestras se diluyeron hasta una concentración en el rango de 2-5 µg/µl y se mezclaron con una matriz gel y con 1 M de ditioneitol (DTT) para garantizar condiciones reductoras. Seguidamente las muestras se desnaturalizaron a 95-100 °C durante 5 minutos y se cargaron en el chip (Figura 5.16). El chip contiene posiciones para analizar hasta 10 muestras distintas, así como una posición para una mezcla de marcador de peso molecular. Se utilizaron muestras estándares de albúmina serica bovina (BSA) y anhidrasa carbónica (CA) como controles. Finalmente, los datos se analizaron con el programa Agilent 2100 Expert Software, con el que se pudo cuantificar la señal detectada por el equipo (Figura 5.17).

**Figura 5.16.** Bioanalizador con los 4 chips diferentes para RNA, DNA, proteínas y células



**Figura 5.17.** Imagen de la electroforesis capilar de muestras de plasma seminal de caballos. L) Marcador de peso molecular, 1) Control de BSA, 2) Alegre, 3) Faraón, 4) Ojeado, 5) Udón, 6) Control de anhidrasa carbónica, 7) Alegre, 8) Faraón, 9) Ojeado y 10) Udón



### **5.7.3.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida en dos dimensiones 2D**

La técnica de 2D consiste en acoplar una primera separación de las muestras mediante isoelectroenfoque (primera dimensión) con una segunda distribución por tamaño molecular mediante SDS-PAGE (segunda dimensión).

Este estudio de las proteínas se llevó a cabo en la Sección de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia, y para ello se utilizaron las muestras del plasma seminal previamente liofilizadas y conservadas a -80°C hasta el momento de su uso.

Las muestras del plasma seminal liofilizadas se resuspendieron en una solución de lavado (10 mM de Tris, pH 8'0 y 5 mM acetato de magnesio), seguidamente se determinó la concentración por el método BCA antes descrito y finalmente las muestras se diluyeron hasta alcanzar una concentración de 10 µg/µl en una solución de lisis (30 mM Tris pH 8'5, 7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, pH 8).

### **5.7.3.4. Electroforesis bidimensional diferencial (sistema 2D-DIGE)**

El sistema de electroforesis diferencial DIGE (Differential In Gel Electroforesis) es una técnica alternativa de la electroforesis bidimensional clásica, donde se pueden marcar con fluorocromos de diferentes colores las proteínas de varias muestras antes de ser separadas en un único gel. Lo que permite el estudio diferencial de la distribución de las proteínas entre las diferentes muestras y la cuantificación de las mismas.

#### **5.7.3.4.1. Marcaje de las muestras con las sondas**

Para el marcaje de las muestras se utilizó el kit Amersham CyDye DIGE Fluors for Ettan DIGE (minimal dyes, 5 nmol) (GE Healthcare, 25-8010-65). Este kit incluye 3 sondas fluorescentes; 1) CyDye2 (1 vial de 5 nmol): amarillo, para el control, 2) CyDye3 (1 vial de 5 nmol): rojo, para una muestra y 3) CyDye5 (1 vial de 5 nmol): azul, para otra muestra.

Las sondas se resuspendieron en 5 µl de dimetilformamida (DMF) fresco (Fluka Sigma-Aldrich 22705-6) para obtener una concentración stock final de 1 mM. La mezcla de trabajo de cada sonda se preparó diluyendo las mezclas originales hasta una concentración de 0'4 mM, utilizando la solución de DMF. Todo el proceso se llevó a cabo en la oscuridad debido a la sensibilidad de las sondas a la luz. Siguiendo las

recomendaciones del fabricante para el marcaje de las muestras con las sondas fluorescentes se utiliza un ratio de 50 µg de proteína por 400 pmol de sonda. Dado que disponíamos de 3 muestras (Plasma seminal de tres sementales: Alegre, Faraón y Ojeado) y en cada gel se pueden comparar directamente sólo dos de ellas, reservamos una de las sondas para la mezcla de referencia siguiendo las recomendaciones del kit, nuestra planificación supuso preparar 3 geles.

Con el fin de conseguir una mejor resolución, para la electroforesis bidimensional se seleccionó la combinación de las tiras de 17 cm ReadyStrip IPG pH 3-10NL Strips (Bio-Rad) para la primera dimensión o isoelectroenfoque, junto con geles SDS-PAGE al 12 % de tamaño 18x20 cm (Maxigel) para la segunda dimensión o separación por peso molecular. Esta combinación permite una carga total de proteína de unos 300 µg por gel. La distribución de muestras en los tres geles se explica en la siguiente Tabla 5.14.

**Tabla 5.14.** Marcaje de las muestras con las sondas fluorescentes

Sondas	Gel. 1 (300 µg totales )	Gel. 2 (300 µg totales )	Gel. 3 (300 µg totales )
CyDye2	Referencia 100 µg	Referencia 100 µg	Referencia 100 µg
CyDye3	PS Alegre 100 µg	PS Alegre 100 µg	PS Ojeado 100 µg
CyDye5	PS Faraón 100 µg	PS Ojeado 100 µg	PS Faraón 100 µg

Según las recomendaciones del fabricante, la sonda **CyDye2** se utiliza para marcar la muestra de referencia, que en este caso va a suponer una mezcla de las tres muestras reales (PS Alegre, PS Faraón y PS Ojeado). Para preparar esta mezcla de referencia se añadieron en un mismo tubo 100 µg de cada muestra de plasma seminal de Alegre, Faraón y Ojeado (total 300 µg). A este tubo se le añadió 6 µl de la sonda CyDye2 de la mezcla de trabajo 0'4 mM (para que el ratio fuera de 50 µg de proteína por 400 pmol de sonda). Un tercio de esta preparación marcada se utilizó para cada gel como referencia, como se explica en la Tabla 5.14.

Para la preparación de muestra marcada con la sonda **CyDye3** se tomaron 2 viales con 100 µg de PS de Alegre cada uno y 1 vial con 100 µg de Ojeado. Se añadieron 2 µl de

la mezcla de trabajo 0'4 mM de la sonda CyDye3 a cada vial (para que la ratio fuera de 50 µg proteína por 400 pmol de sonda). Por último, para la muestra marcada con la sonda **CyDye5** se tomaron 2 viales que contenían 100 µg de plasma seminal de Faraón cada uno y 1 vial con 100 µg de Ojeado. Se añadieron 2 µl de la mezcla de trabajo 0'4 mM de la sonda CyDye5 a cada vial.

Tras mezclar las proteínas con las sondas, todos los tubos se incubaron en hielo y en oscuridad durante 30 minutos. El marcaje con las sondas se detuvo con 1 µl de 10 mM de lisina, manteniendo los tubos en hielo y oscuridad durante 10 minutos más. Finalmente para la realización de la primera dimensión las muestras marcadas anteriormente se diluyeron en una solución tampón 2X (8 M urea, 4% CHAPS, 130 mM ditiotreitolo (DTT), 2% de anfolitos Bio-Lyte® pH 3-10 (pharmalyte Bio-Rad). Posterior a este paso las muestras se volvieron rehidrar con tampón (8 M urea, 4% CHAPS, 13 mM DTT, 1% de anfolitos Bio-Lyte® pH 3-10 (pharmalyte Bio-Rad) hasta un volumen de de 400-450 µl.

A continuación las muestras se colocaron sobre una tira pH 3-10 de 17 cm de Biorad en la placa de electroforesis y se procedió a la separación siguiendo el programa estándar de tres etapas:

- a) 250 V, 20 min rampa lineal
- b) 10000 V, rampa lineal, 2'5 horas.
- c) 10000 V, 40000 VH, rampa rápida.

La separación se realizó a 20 °C y para evitar un excesivo voltaje sobre las tiras se seleccionó una intensidad máxima de 50 µA/gel. La primera dimensión se completó en un tiempo total de unas 7-8 horas y supuso aproximadamente unos 50000 VH. Al finalizar el proceso, las tiras se conservaron a una temperatura de -70°C.

Para la segunda dimensión, se sacaron las tiras de -70°C y se descongelaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las tiras fueron equilibradas con los tampones I y II durante 10 minutos cada uno (primero el tampón I y luego el II) (Tabla 5.15).

Tras estos lavados o incubaciones, cada tira se aplicó sobre una banda de agarosa al 0'5 % con un bajo punto de fusión de agarosa en tampón tris-glicina-SDS "TGS": 25 mM Tris, 192 mM de glicina, 0'1 % SDS) en la parte superior de un gel SDS-PAGE al 12% 18x20 cm. Se separaron por tamaño aplicando una intensidad de 16 mA/gel durante 15 horas en una cubeta con sistema de recirculación de agua refrigerado a 10 °C.

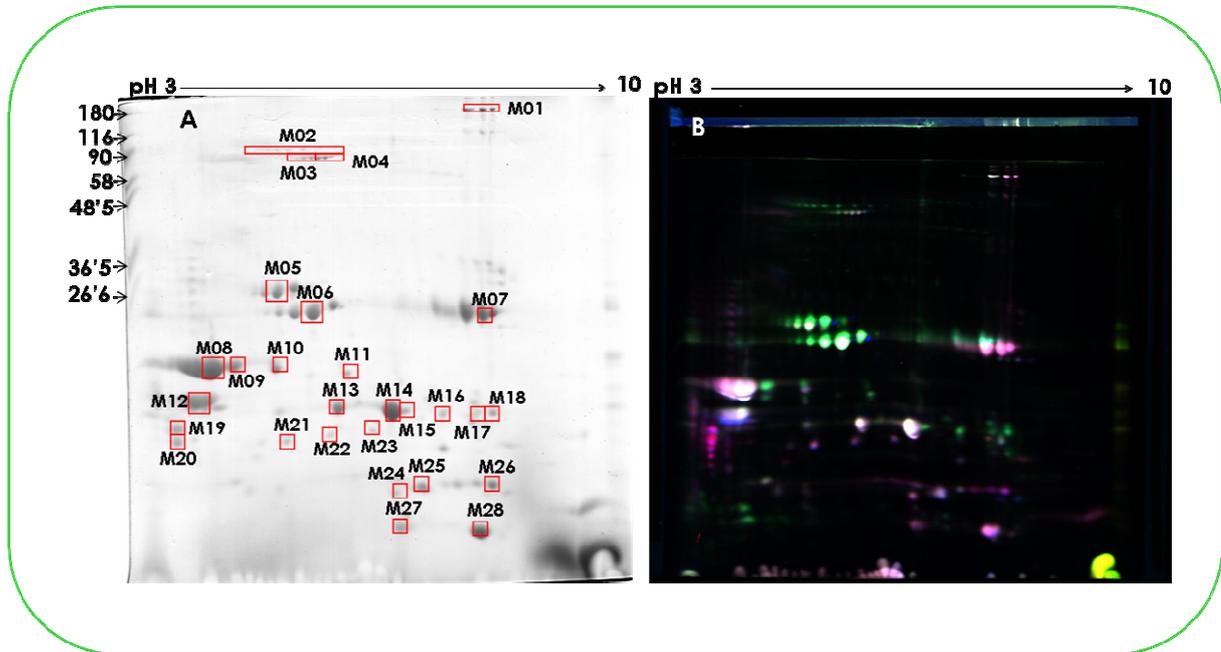
**Tabla 5.15.** Composición de los tampones para equilibrar las tiras

Tampón I	Tampón II
6 M urea	6 M urea
2% SDS	2% SDS
0'375 M Tris pH 8'8	0'375 M Tris pH 8'8
20 % glicerol	20 % glicerol
2% DTT	2'5% DTT Iodoacetamida

Después de finalizar la segunda dimensión los geles se analizaron en el Typhoon Image Scanner, de manera que se detecta una señal azul correspondiente al marcador CyDye2, verde en el caso de CyDye3 y rojo para el marcador CyDye5. Para ello, primero se seleccionó un barrido rápido para determinar el voltaje de cada sonda que genere una señal similar para las tres sondas. Una vez seleccionado el voltaje, se realizó el barrido lento y de alta definición. Durante la adquisición de las imágenes, para la sonda Cy2 se utilizó una longitud de onda de excitación de 480 nm y 520 nm de emisión, para la sonda Cy3 la longitud de onda de excitación fue 532 nm y de la emisión 580 nm y por último la longitud de onda para la Cy5 fue de 633 nm de excitación y 670 nm de emisión.

Finalmente los geles se tiñeron con una disolución comercial de azul de Coomassie (PageBlue, Pierce ThermoScientific) para ver la distribución de las proteínas a simple vista (Figura 5.18).

**Figura 5.18** Imágenes de los geles, A) tinción de azul de coomassie y B) proteínas del plasma seminal marcadas con fluorocromo



### 5.7.3.5. Identificación de proteínas

Una vez realizada la electroforesis bidimensional y tras analizar las imágenes adquiridas tanto de las sondas fluorescentes como de la tinción con azul de Coomassie, se seleccionaron unos puntos o spots para ser analizados mediante una técnica estándar de proteómica para intentar identificar las proteínas presentes en los mismos. El estudio de las bandas seleccionadas para intentar identificar las proteínas que contienen, se llevó a cabo mediante una digestión proteolítica controlada con tripsina y análisis por HPLC acoplado a espectrometría de masas en el Laboratorio de Proteómica de la Sección de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia.

Los spots, puntos o bandas de interés se recortaron de los diferentes geles y se destiñeron con una disolución al 40% de metanol. Una vez transparentes, las bandas se lavaron dos veces en agua Milli Q, y otras dos veces con una disolución al 50% de

acetonitrilo. A continuación, las bandas se secaron usando un concentrador-evaporador por vacío modelo Eppendorf 5301 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) durante 15-30 minutos y tras ello se incubaron con 50 µl de tampón bicarbonato amónico 25 mM de pH 8'5 con 25 mM DTT (43815), a 56°C durante 20 minutos con el fin de reducir las muestras y romper los posibles puentes disulfuro presentes en las mismas. Después se eliminó el sobrenadante y se añadieron radicales alquilo a las muestras reducidas para bloquear los posibles grupos -SH libres de las cisteínas mediante la adición de 50 µl de tampón bicarbonato amónico 25 mM de pH 8'5 con 55 mM iodoacetamida (IAA) (A3221) durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Seguidamente se eliminó el sobrenadante y las bandas se lavaron primero con agua Milli Q, después con tampón bicarbonato amónico 25 mM de pH 8'5 y a continuación con tampón bicarbonato amónico 25 mM de pH 8'5 en 50% de acetonitrilo, durante 10 minutos a 37°C cada vez.

Después de estos lavados, las bandas se secaron usando el concentrador-evaporador durante 15-30 minutos. A continuación, las bandas se rehidrataron en 50 µl de tampón bicarbonato amónico 25 mM de pH 8'5 con ProteaseMax Surfactant 0'01% (Promega) y aproximadamente 0'5 µg de Tripsina Grado de Proteómica (Trypsin Gold, Promega) durante 10 minutos a temperatura ambiente. ProteaseMax Surfactant es un detergente que facilita y potencia la actividad proteolítica de la tripsina y que es compatible con el procesamiento posterior de las muestras. Una vez rehidratadas las bandas, éstas se sometieron a digestión durante 3 horas a 37°C en agitación constante.

Pasado este tiempo, la reacción de digestión se detuvo con 0'5% de ácido trifluoroacético (TFA) y el sobrenadante se recogió en un tubo nuevo. Las bandas se lavaron con 50 µl de una solución al 50 % de acetonitrilo y 0'5 % de TFA durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente se realizó otro lavado con 50 µl de acetonitrilo y 0'5 % de TFA durante 10 minutos a 37°C. Estos lavados permitieron mejorar y optimizar la extracción de los fragmentos peptídicos digeridos de las bandas del gel. Después de cada lavado, los sobrenadantes procedentes de una misma banda se recogieron en el mismo tubo y se secaron usando el concentrador-evaporador.

La separación y análisis de las digestiones con tripsina de las muestras se realizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC/MS-MS) mediante un sistema que consiste en un HPLC modelo Serie 1100 de Agilent Technologies (Santa Clara, California, EEUU), termostaticado y equipado con un muestreador automático y una bomba capilar. Este HPLC está conectado a un Espectrómetro de Masas tipo Trampa de Iones modelo Agilent Ion Trap XCT Plus (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EEUU) usando una interfase tipo electrospray (ESI).

Las muestras que previamente habían sido secadas mediante el concentrador-evaporador por vacío se resuspendieron en 10 µl de tampón A, el cual consiste en una mezcla de agua Milli Q: acetonitrilo: ácido fórmico (94'9:5:0'1), (v/v) y se inyectaron mediante un flujo de 10 µl/minuto en una columna de HPLC tipo Zorbax SB-C18 (5 µm, 150 × 0'5 mm, Agilent Technologies, Santa Clara, California, EEUU), la cual se encontraba a 40°C en un compartimiento termostatzado. Después de la inyección de la muestra, la columna se lavó con tampón A durante 10 minutos. Posteriormente los péptidos digeridos se eluyeron de la columna usando un gradiente lineal de 0 a 80 % de un tampón B compuesto por una mezcla de agua MilliQ: acetonitrilo: ácido fórmico (10: 89'9: 0'1; v/v) durante 150 minutos. Los componentes eluidos de la columna se acoplaron en línea al espectrómetro de masas utilizando una fuente electrospray (ESI).

El espectrómetro de masas analizó los iones en modo positivo, con un voltaje en el capilar de 3500 V y una velocidad de barrido de 8100 (m/z)/segundo, en el rango de medida desde 100-2200 m/z. La presión del gas de nebulización (nitrógeno) se mantuvo en 15 psi, a un flujo de 5 litros/minuto y a una temperatura de 350°C. Los datos de MS/MS se recogieron de forma automatizada, de manera que en cada barrido los cinco iones más intensos se fragmentaron secuencialmente mediante una disociación inducida por colisión (CID) utilizando helio, con una ventana de aislamiento de 2 m/z de anchura y una energía relativa de fragmentación por colisión del 35 %.

El análisis de los datos obtenidos se realizó con el programa de análisis LC/MSD Trap Data Analysis Versión 3.3 (Bruker Daltonik, GmbH, Alemania) y la búsqueda de coincidencias se llevó a cabo con la plataforma Spectrum Mill (Spectrum Mill Proteomics Workbench Rev. A.03.02.060B, Agilent Technologies, Santa Clara, California, EEUU). Para esta búsqueda de coincidencias, los datos iniciales se sometieron a un proceso de procesamiento o extracción con este software teniendo en cuenta los siguientes parámetros: carbamidometilación posible de los residuos de cisteína; [MH]<sup>+</sup> 100–10000 m/z; carga máxima +7; relación señal-ruído (S/N) mínima 25; detección de señales <sup>12</sup>C. Una vez procesados los datos iniciales, la búsqueda de los datos MS/MS se realizó frente a las secuencias de las proteínas incluidas en la base de datos de NCBI nr de mamíferos y familia de equinos, con el siguiente criterio: modo de búsqueda en identidad; digestión con tripsina con un máximo de 3 sitios de rotura consecutivos obviados; residuos de cisteína con carbamidometilación posible; carga de péptidos +1, +2, +3; masas monoisotópicas; tolerancia de la masa del péptido precursor 2'5 Da; tolerancia en la masa del producto de los iones seleccionados 0'7 uma; equipo utilizado ESI-trampa de iones de alta resolución; intensidad mínima del pico seleccionado 50%; posible fosforilación de los residuos de serina, treonina y tirosina. El programa Spectrum Mill otorga una puntuación (score) a cada péptido detectado en función básicamente de la intensidad y precisión de la señal, así

como un valor (SPI) que tiene que ver con el porcentaje de señales detectadas experimentalmente de cada fragmento respecto al número de señales teóricas que debería producir. Como norma general, se considera aceptable un score superior a 8 y un SPI superior al 70%.

### **5.8. Diseño experimental**

Este trabajo se estructuró en 3 experiencias. En la primera experiencia se estudió el efecto del tiempo de conservación del epidídimo en refrigeración a 4°C, desde 0 hasta 96 horas, sobre la cantidad y calidad de los espermatozoides antes y después de la congelación.

En la segunda experiencia se estudió el efecto de la preincubación de los espermatozoides en plasma seminal de diferentes sementales antes de la criopreservación sobre la calidad espermática.

Finalmente, en la tercera experiencia se estudió la composición de las muestras de plasma seminal utilizados en la experiencia anterior, analizándose la composición en ácidos grasos, proteínas y la capacidad antioxidante total.

#### **5.8.1. Experiencia 1. Estudio del efecto del tiempo de conservación del epidídimo en refrigeración a 4°C (0, 24, 48, 72 y 96 horas) sobre la calidad espermática antes y después de la congelación**

En esta fase experimental se estudió el efecto del tiempo de conservación de los epidídimos de caballo en condiciones de refrigeración (4°C) sobre la calidad espermática de las muestras frescas y criopreservadas. Esta experiencia se diseñó con el fin de conocer si los espermatozoides procedentes de epidídimos conservados a 4°C hasta 96 horas podrían ser criopreservados sin que se viese afectada su calidad.

Los epidídimos que llegaron al laboratorio fueron asignados de forma aleatoria y equitativa a los 5 tiempos de conservación estudiados: 0, 24, 48, 72 y 96 horas de conservación a 4°C (figura 5.19). Esta experiencia la dividimos que corresponden con las tres etapas del proceso de congelación donde se evaluaron diferentes parámetros que a continuación detallamos:

Etapa 1:

Tras la conservación de los epidídimos a 4°C se procedió a la obtención de los espermatozoides y la evaluación de los siguientes parámetros de calidad:

- volumen del fluido epididimario
- concentración
- viabilidad espermática

Etapas 2:

Tras diluir las muestras en el medio de congelación y mantenerlos durante 30 minutos a 4°C se analizó:

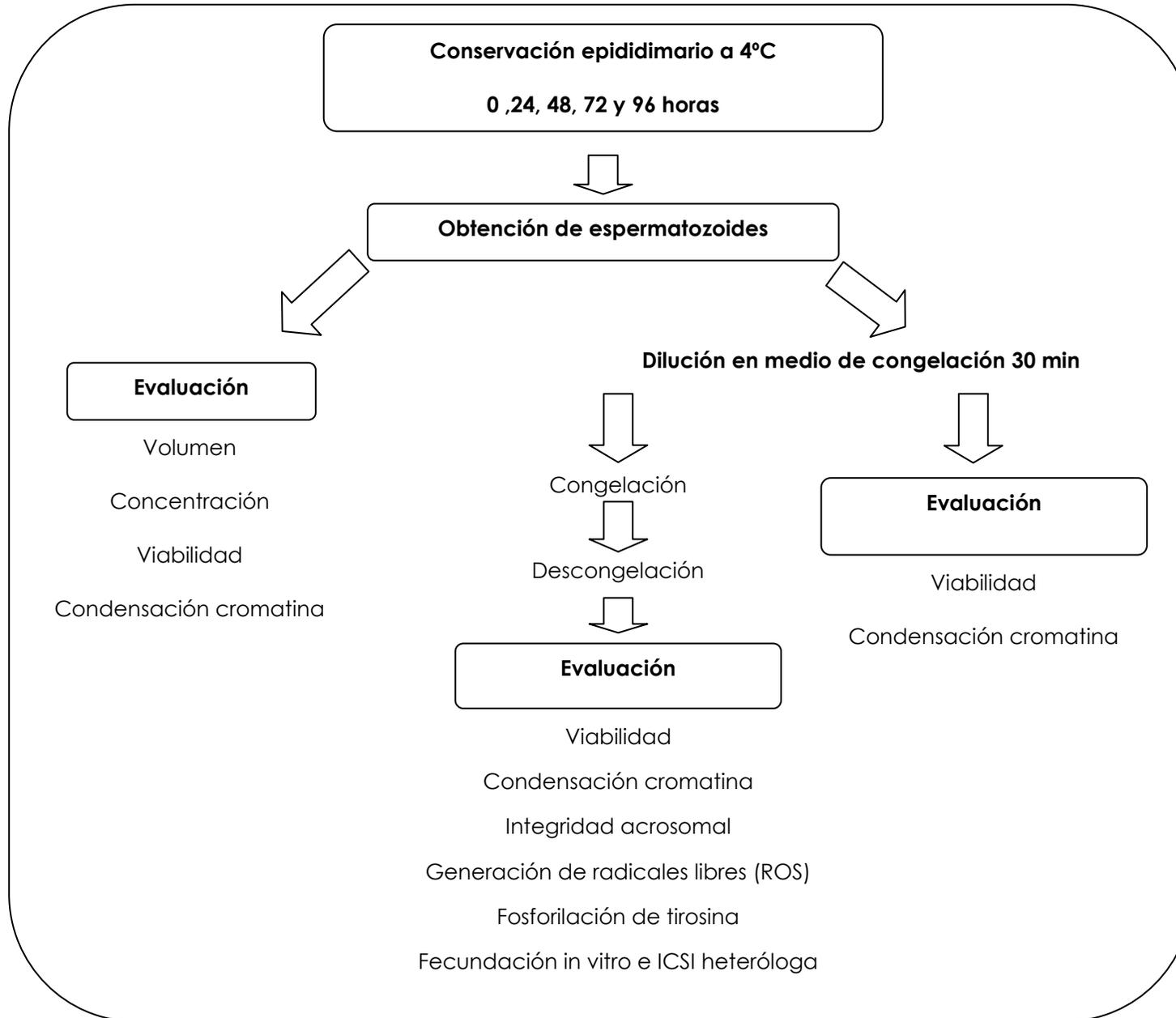
- viabilidad espermática
- condensación de la cromatina

Etapas 3:

La calidad de las muestras congeladas-descongeladas se evaluó mediante las siguientes determinaciones:

- Viabilidad
- Condensación de la cromatina
- Integridad acrosomal
- Generación de radicales libres (ROS)
- Fosforilación de tirosina de proteínas tras la incubación en medio de capacitación
- Penetración in vitro de ovocitos bovinos libres de zona pelúcida (FIV)
- Descondensación nuclear en ovocitos bovinos tras la Inyección de espermatozoides (ICSI)

**Figura 5.19.** Esquema representativo de la experiencia 1



### **5.8.2. Experiencia 2. Efecto de la incubación de los espermatozoides de epidídimo con plasma seminal antes de la congelación sobre la calidad espermática post descongelación**

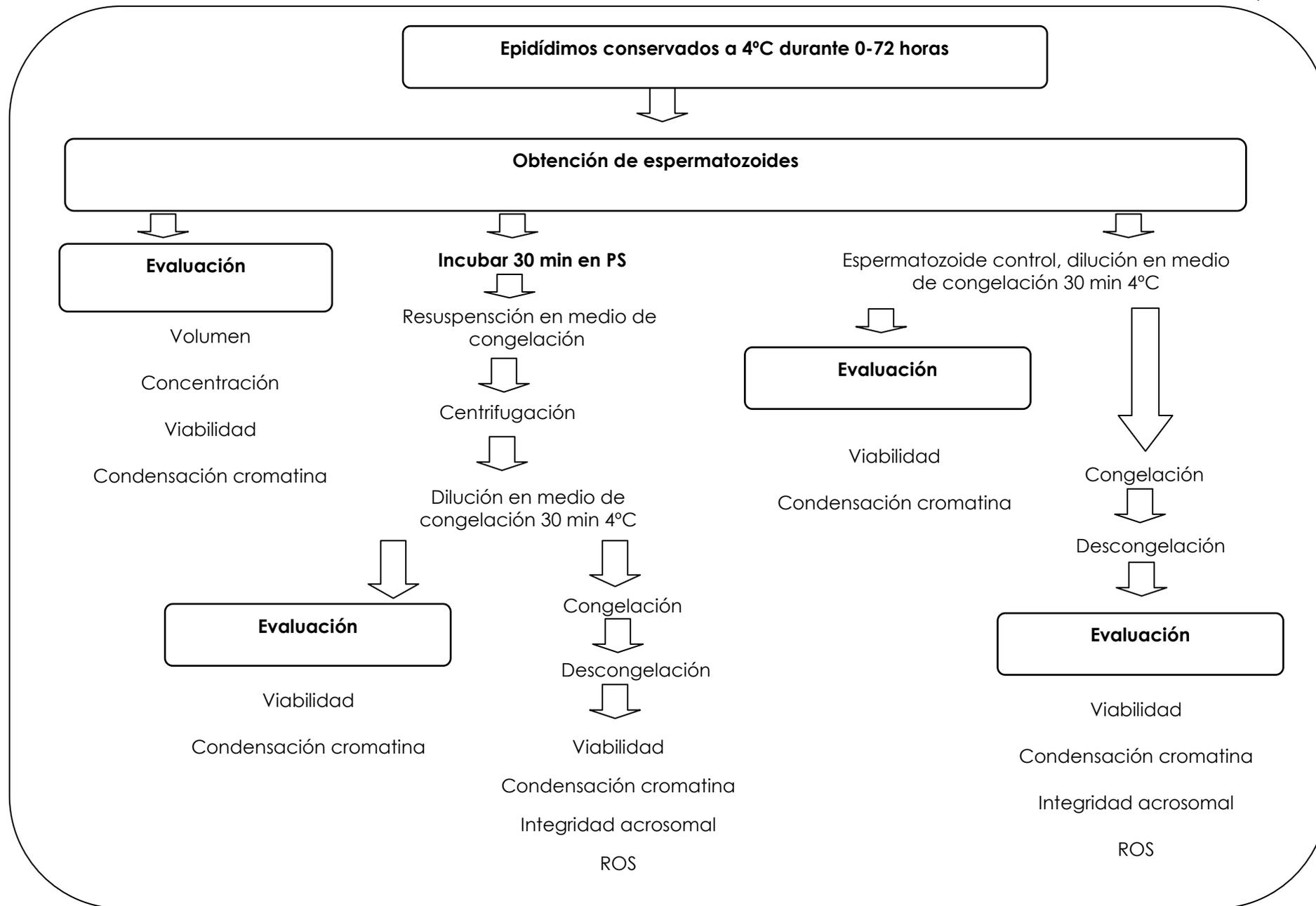
La presencia de plasma seminal en el proceso de congelación espermática en caballo ha ofrecido unos resultados contradictorios (Aurich et al., 1996; Brinsko et al., 2000; Heise et al., 2010). Nos planteamos en esta experiencia analizar si la incubación antes de la congelación de los espermatozoides epididimarios en presencia de plasma seminal procedente de diferentes sementales podría afectar a los parámetros espermáticos post-congelación. Para desarrollar esta experiencia, obtuvimos el plasma seminal procedente de 4 sementales.

Los espermatozoides se obtuvieron de epidídimos refrigerados a 4°C durante el periodo 0-72 ya que en este intervalo de tiempo no observamos diferencias en la calidad de la criopreservación como quedó demostrado en la experiencia 1. De las muestras espermáticas obtenidas de los epidídimos procedimos, como primera fase, a evaluar de forma rutinaria: volumen, concentración y viabilidad. Se seleccionaron aquellas muestras que tuviesen al menos  $150 \times 10^6$  espermatozoides totales y una viabilidad superior al 90% en el momento de su recogida.

De las muestras de fluido epididimario obtenidas se tomaron dos alícuotas. A una de ellas se le adicionó plasma seminal hasta alcanzar la proporción del 80% de plasma y 20% de fluido epididimario y se mantuvo durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se procedió a la adición de 5 ml del medio de congelación. Seguidamente se centrifugó a 700 g durante 5 minutos a 4°C y el pellet resultante se volvió a resuspender en el medio de congelación dejándolos en este medio a 4°C durante otros 30 minutos para el equilibrado de la muestra. Mientras que la otra alícuota de fluido epididimario no se le adicionó plasma seminal (control) y se mantuvo en las mismas condiciones a 4°C y se resuspendieron directamente en el medio de congelación tal y como se describe en el apartado anterior (5.8.1)

Transcurrido el tiempo de equilibrado en el medio de congelación, se evaluó la viabilidad y condensación de la cromatina, y se continuó con el proceso de congelación. Tras la descongelación de las muestras, los parámetros evaluados fueron: viabilidad, condensación de la cromatina, integridad del acrosoma y la generación de radicales libres. En la (figura 5.20) viene reflejado un esquema de los pasos realizados en esta experiencia.

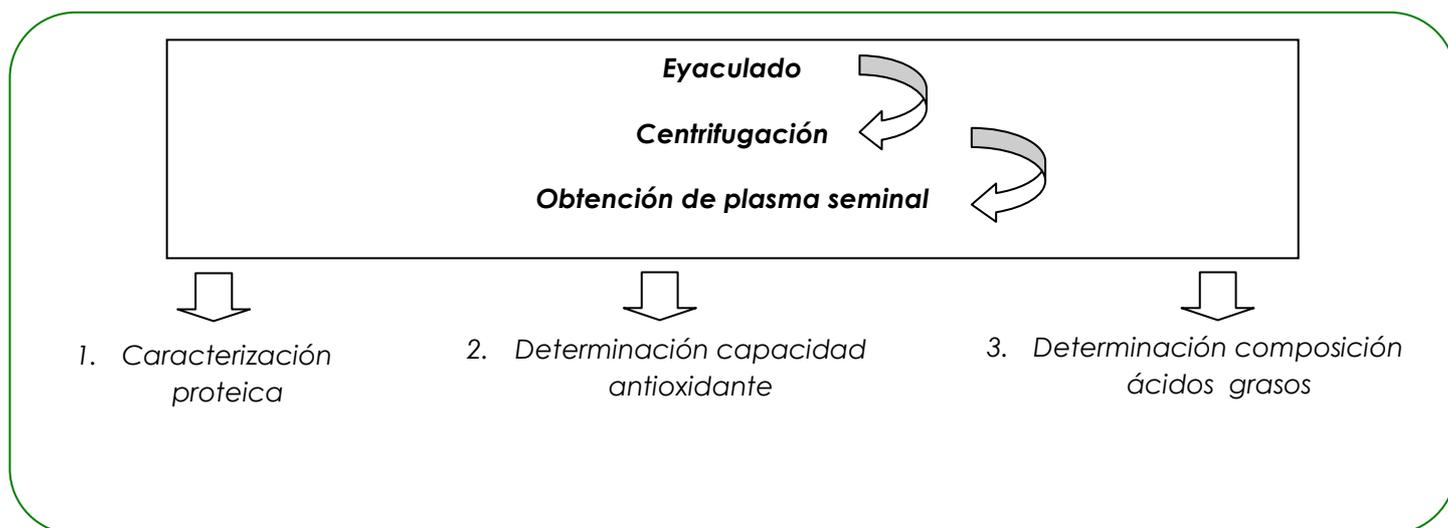
**Figura 5.20.** Esquema representativo de la experiencia 2



### 5.8.3. Experiencia 3. Caracterización del plasma seminal de caballos: proteínas capacidad antioxidante y ácidos grasos

Una vez que se evidenció en la experiencia 2 que los efectos de la adición del plasma seminal sobre los resultados post-descongelación era diferente de acuerdo al semental del cual procedía la muestra de plasma, se diseñó esta tercer y última experiencia con el objetivo de estudiar y caracterizar los componentes del plasma seminal utilizado en la experiencia anterior que mostraron afectar de forma diferente a los resultados de de la criopreservación espermática.

**Figura 5.21.** Esquema representativo de la experiencia 3



### 5.9. Análisis estadístico

Se hizo uso del programa Excel 2007 para la gestión de los datos y los programas SPSS v 19 y Sytat v13 para realizar el análisis estadístico propiamente dicho. Los datos de los resultados se expresaron como media  $\pm$  SEM.

En la experiencia 1, los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía, considerando el tiempo de conservación de los epidídimos como la variable principal.

Cuando ANOVA reveló un efecto significativo, se aplicó una prueba post-hoc (test de Tukey). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativo en  $p < 0.05$ .

En la experiencia 2, los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía, considerando la incubación en presencia de plasma seminal de diferentes machos como la variable principal. En determinados casos se aplicó un análisis ANOVA de dos vías teniendo en consideración el tratamiento con plasma seminal y el tiempo de incubación, así como la interacción entre ambos factores.

En la experiencia 3, los datos de capacidad antioxidante total y concentración de proteínas fueron analizados mediante un ANOVA de una vía, considerando el animal donante de la muestra de plasma seminal el factor principal. Del mismo modo se aplicó un análisis de ANOVA de una vía para comparar la presencia de las diferentes proteínas en el sistema de electroforesis diferencial.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. *Experiencia 1. Estudio del efecto del tiempo de conservación del epidídimo (0, 24, 48, 72 y 96 horas) a 4°C sobre la calidad espermática antes y después de la congelación.*

Mediante la técnica de obtención retrógrada se recogió con éxito el fluido epididimario de todas las muestras disponibles (100%), que sumaron un total de 82 epidídimos.

#### 6.1.1. *Volumen del fluido epididimario y concentración espermática*

Las muestras del fluido epididimario presentaron un volumen medio de  $720 \pm 159$   $\mu\text{l}$  y una concentración espermática de  $6'5 \pm 0'4 \times 10^9$  espermatozoides/ml, lo que supuso un número total de  $4'7 \pm 0'7 \times 10^9$  de espermatozoides por epidídimo. No se observaron diferencias significativas entre los valores de la concentración espermática en las muestras epididimarias obtenidas en diferentes días de conservación a 4°C ( $p > 0.05$ , Tabla 6.1), ni en el volumen del fluido obtenido.

#### 6.1.2. *Viabilidad espermática*

La viabilidad espermática en las muestras de fluido epididimario recién obtenidas del grupo control (tiempo de conservación 0 h) fue superior al 85% (Tabla 6.2). La viabilidad se mantuvo con valores superiores al 80% en las muestras procedentes de epidídimos conservados a 4°C durante 24, 48 y 72 horas y sólo las muestras conservadas 96 horas presentaron una viabilidad significativamente inferior al grupo control (Tabla 6.2,  $p < 0.01$ ). Cuando se analizó la viabilidad de los espermatozoides epididimarios una vez que se habían diluido en el medio de congelación y mantenidos a 4°C durante 30 min, se observó que se mantenían en valores similares durante las primeras 48 horas de conservación (Tabla 6.2,  $p > 0.05$ ). Sin embargo, la viabilidad se redujo significativamente en los espermatozoides procedentes de los epidídimos conservados después de 72 y 96 horas comparado con el grupo control (0 horas de conservación) (Tabla 6.2,  $p < 0.05$ ).

**Tabla 6.1.** Concentración de espermatozoides obtenida ( $\times 10^9$  espermatozoides/ml) en el fluido epididimario procedente de epidídimos conservados a 4°C de 0 a 96 horas

Tiempo de conservación (h)	Concentración ( $\times 10^9$ cells/mL)
0	5'3 $\pm$ 0'4
24	6'3 $\pm$ 1'1
48	6'0 $\pm$ 0'9
72	7'7 $\pm$ 0'8
96	7'7 $\pm$ 0'9
<b>Total</b>	6'5 $\pm$ 0'4

**Tabla 6.2.** Viabilidad de los espermatozoides obtenidos de epidídimos conservados a 4°C de 0 a 96 horas. Muestras frescas y muestras diluidas en el medio de congelación durante 30 minutos a 4°C

Tiempo de conservación (h)	Muestras frescas	Muestras diluidas a 4°C, 30 min
0	86'5 $\pm$ 1'3 <sup>a</sup>	84'9 $\pm$ 2'0 <sup>a</sup>
24	84'4 $\pm$ 1'3 <sup>ab</sup>	79'1 $\pm$ 1'7 <sup>ab</sup>
48	84'0 $\pm$ 2'0 <sup>ab</sup>	80'0 $\pm$ 2'2 <sup>ab</sup>
72	81'1 $\pm$ 2'0 <sup>ab</sup>	76'0 $\pm$ 2'4 <sup>bc</sup>
96	77'2 $\pm$ 2'6 <sup>b</sup>	67'6 $\pm$ 2'8 <sup>c</sup>
<b>P value</b>	0.01	<0.01

<sup>a,b,c</sup> en la misma fila indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

La viabilidad espermática de las muestras congeladas-descongeladas no se vio afectada por el tiempo de conservación del epidídimo (Tabla 6.3,  $p > 0.05$ ). En todos los grupos estudiados se observaron valores próximos al 35% de vivos inmediatamente después de la descongelación, produciéndose un descenso de la viabilidad a los 30 min y 120 min de incubación a 37°C (Tabla 6.3,  $p < 0.05$ ).

**Tabla 6.3.** Viabilidad de los espermatozoides de epidídimo congelados y descongelados obtenidas de las muestras conservadas a 4°C hasta 96 horas. La viabilidad fue evaluada a los 0 minutos, a los 30 minutos y a los 120 minutos tras la descongelación

Viabilidad espermática (min)			
Tiempo de conservación (h)	0 min	30 min	120 min
0	35'3±4'2	23'0±3'1	17'8±2'9
24	35'8±5'0	22'1±3'6	12'7±2'7
48	32'6±1'7	20'7±3'1	14'5±2'3
72	37'9±3'9	20'3±2'3	13'4±1'1
96	36'5±2'4	26'0±2'3	17'6±1'5
<b>Total</b>	35'7±1'4 <sup>a</sup>	22'8±1'2 <sup>b</sup>	15'5±0'9 <sup>c</sup>

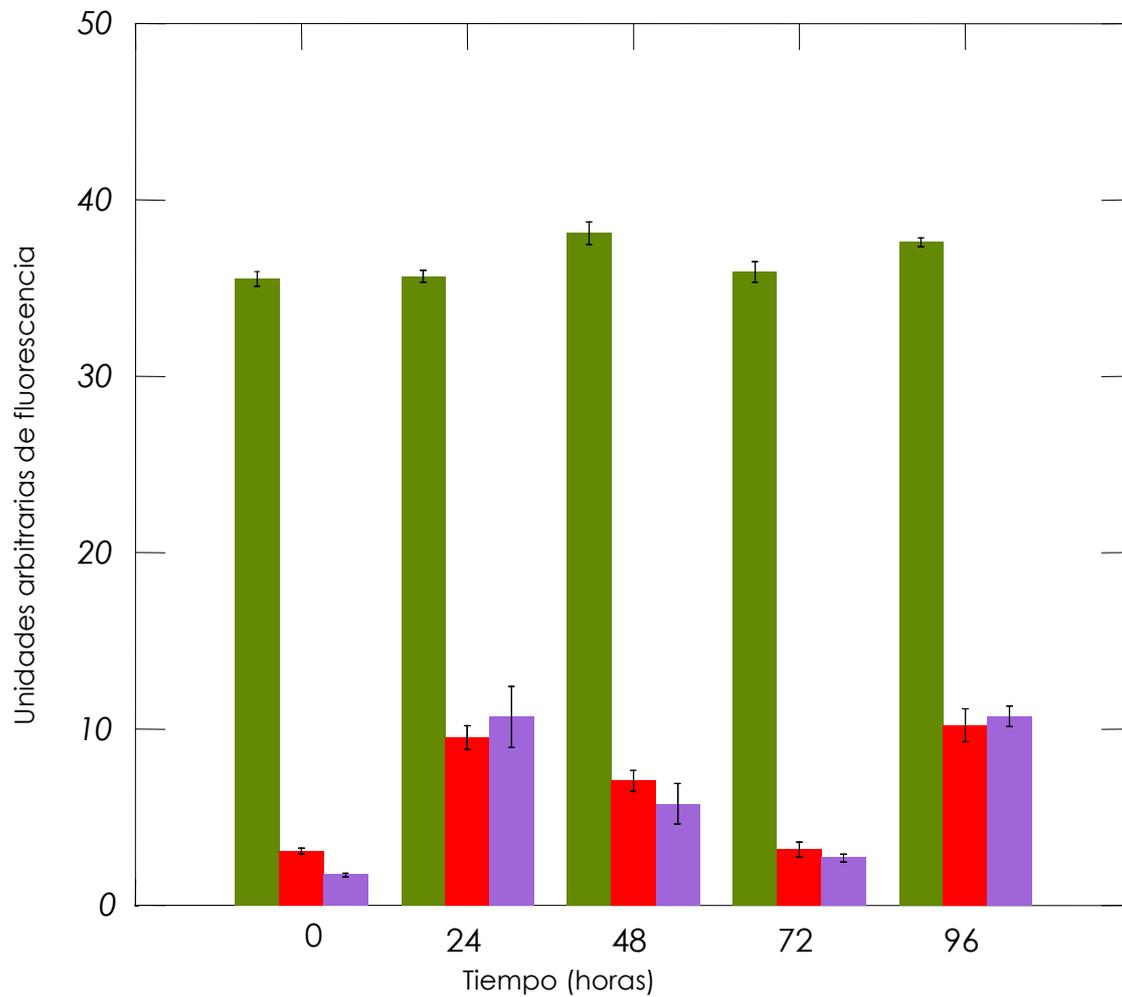
<sup>a,b,c</sup> en la misma columna indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

### 6.1.3. Condensación de la cromatina

La condensación de la cromatina de las muestras recién obtenidas fue similar en todos los grupos con diferentes tiempos de conservación de los epidídimos (Figura 6.1,  $p > 0.05$ ). Se mantuvieron en un nivel de condensación reducido con elevada absorción del colorante yoduro de propidio. Sin embargo, tras el proceso de enfriamiento en el medio de congelación a 4°C durante 30 minutos y la congelación-descongelación se observó un aumento significativo en la condensación de la

cromatina (hipercondensación), que se tradujo en una menor absorción de yoduro de propidio y una intensidad de la fluorescencia menor (Figura 6.1,  $p < 0.05$ ), con valores similares en todos los grupos experimentales analizados (Figura 6.1,  $p > 0.05$ ).

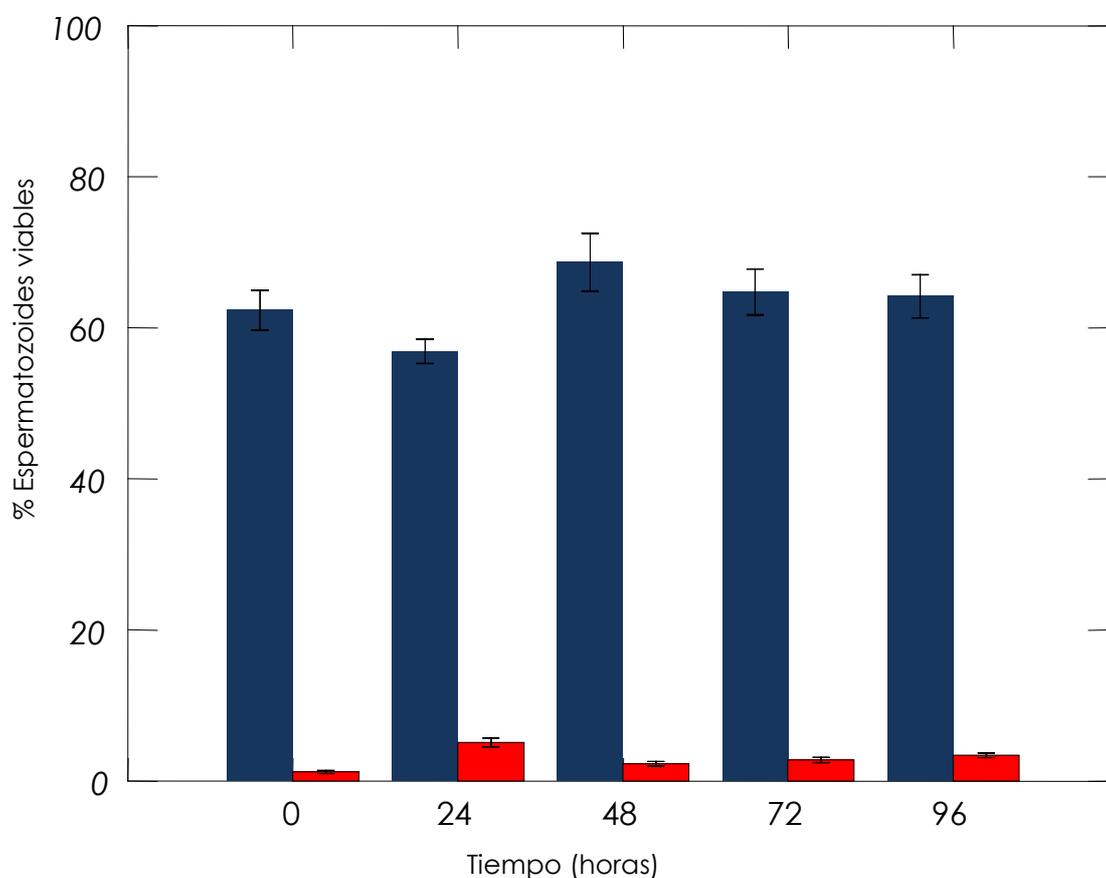
**Figura 6.1.** Condensación de la cromatina de los espermatozoides de epidídimo de caballo conservado a 4°C de 0 a 96 horas. Espermatozoides recién obtenidos (barra verde), espermatozoides diluidos durante 30 minutos en el medio de congelación (barra roja) y espermatozoides congelados (barra violeta)



#### 6.1.4. Evaluación de la viabilidad e integridad acrosomal

En las muestras congeladas-descongeladas se evaluó simultáneamente la integridad acrosomal y la viabilidad espermática mediante citometría de flujo. Tanto el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto como el de vivos con acrosoma alterado no se vieron afectados por las horas de la conservación de los epidídimos ya que se comportaron de manera similar en todos los tiempos de conservación estudiados (Figura 6.2,  $p > 0.05$ ). En todos los casos, el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto fue superior al 60%, mientras que la proporción de espermatozoides vivos con el acrosoma alterado fue inferior a 5% (Figura 6.2,  $p > 0.05$ ).

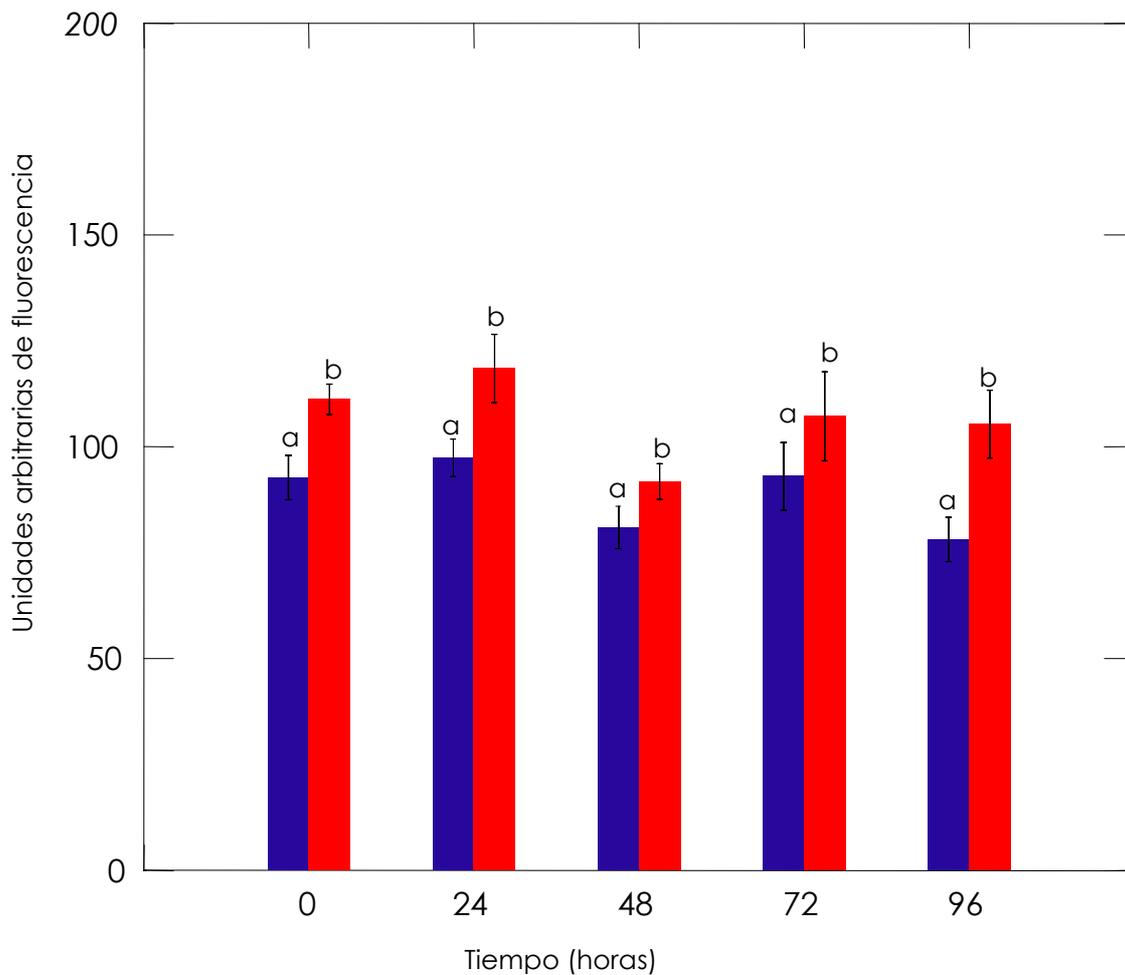
**Figura 6.2.** Datos de viabilidad e integridad acrosomal de los espermatozoides de epidídimo de caballo conservado a 4°C de 0 a 96 horas. Espermatozoides viables con acrosoma intactos (barra azul) y alterado (barra roja)



### 6.1.5. Generación de las especies reactivas de oxígeno (ROS)

La generación de ROS en las muestras espermáticas congeladas-descongeladas se evaluó tras 30 y 60 minutos de incubación a 37°C. A medida que aumenta el tiempo de incubación se incrementó la producción de ROS (Figura 6.3,  $p < 0.05$ ), pero no se detectaron diferencias entre los diferentes grupos experimentales (Figura 6.3,  $p > 0.05$ ).

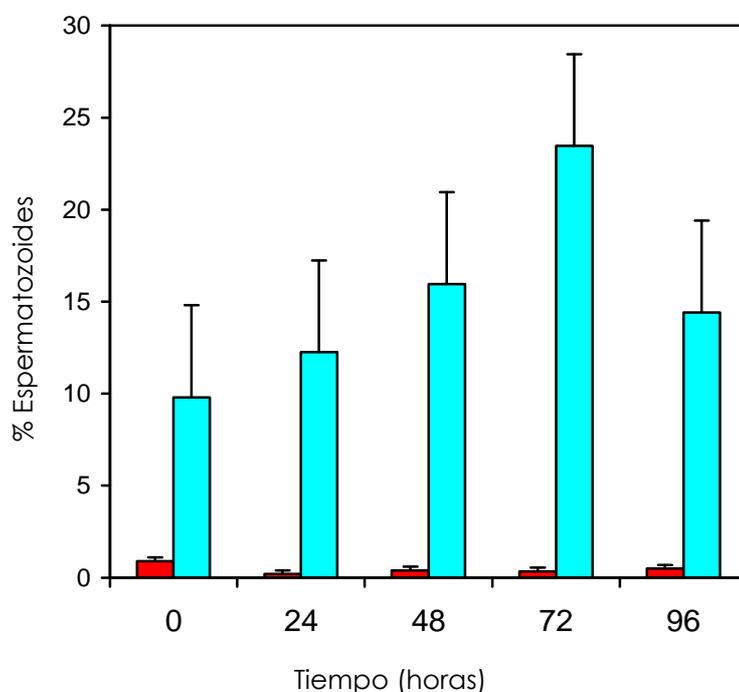
**Figura 6.3.** Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) de las muestras congeladas-descongeladas a los 30 minutos de la incubación (barra azul) y 60 minutos de la incubación (barra roja)



### 6.1.6. Localización de la fosforilación de la tirosina

Las muestras congeladas y descongeladas incubadas en medio no capacitante (PBS libre de calcio y magnesio, medio control) mostraron un patrón de fosforilación de tirosina similar en todos los grupos de conservación estudiados (0 a 96 h; Figura 6.4,  $P > 0.05$ ).

**Figura 6.4.** Espermatozoides con proteínas fosforiladas. Muestras procedentes de epidídimos conservados a 4°C de 0 a 96 horas, posteriormente congelado y descongelado en medio no capacitante. Región sub ecuatorial (barra roja), región de la cola (barra azul)



Cuando los espermatozoides fueron incubados en el medio de capacitación (Sperm-TALP) observamos un incremento en el porcentaje de fosforilación de la tirosina en la región subecuatorial de la cabeza espermática con respecto al grupo control, es decir aquellos que habían sido incubado en el medio no capacitante (PBS libre de calcio y magnesio) (Tabla 6.4,  $p < 0.05$ ). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en la fosforilación de la región de la cola espermática.

**Tabla 6.4.** Fosforilización de la tirosina observado en los espermatozoides epididimario congelado-descongelado incubado en Sperm-TALP (medio de capacitación) y medio control (PBS libre de calcio y magnesio)

	Patrón de fosforilación		
	Cola	Segmento sub ecuatorial	Sin señal
<b>Control</b>	9'4±2'3	2'7±0'5 <sup>a</sup>	68'8±3'5 <sup>a</sup>
<b>Sperm-TALP</b>	7'5±1'5	33'5±5'2 <sup>b</sup>	46'4±4'3 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> en la misma columna indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

#### 6.1.7. Fecundación heteróloga ICSI e FIV

Se inyectaron espermatozoides congelados y descongelados equinos procedentes de epidídimos conservados en diferentes tiempos (0 a 96 horas) a un total de 59 ovocitos bovinos madurados in vitro. Por otra parte, en un sistema de FIV heteróloga se incubaron un total de 209 ovocitos bovinos libres de zona pelúcida con espermatozoides equinos congelados-descongelados de los diferentes grupos experimentales (0 a 96 horas). Tanto en los ovocitos inyectados como en los procedentes de FIV fue posible observar la formación de los pronúcleos masculino y femenino en todos los grupos experimentales con porcentajes variables (Tabla 6.5,  $p < 0.05$ ).

**Tabla 6.5.** Formación de pronúcleos en ovocitos tras ICSI y FIV con espermatozoides epididimarios congelados-descongelados obtenidos de epidídimo conservados a 4°C hasta 96 horas

Tiempo de conservación (h)	ICSI		FIV	
	Número de ovocitos	Formación de pronucleo (%)	Número de ovocitos	Formación de pronucleo (%)
0	22	2 (18'1)	106	3 (2'8) <sup>a</sup>
24	13	1 (7'6)	72	7 (9'7) <sup>a</sup>
48	5	1 (20)	7	4 (57'1) <sup>b</sup>
72	10	4 (40)	11	1 (9'0) <sup>a</sup>
96	9	5 (55'5)	13	2 (15'3) <sup>a</sup>
<b>Total</b>	59	9 (15'25)	209	17 (8'13)

<sup>a,b</sup> en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

**6.2. Experiencia 2. Efecto de la incubación de espermatozoides de epidídimo durante 30 minutos con plasma seminal procedente de diferentes machos sobre la calidad de espermatozoides congelados-descongelados.**

En esta segunda experiencia se emplearon los espermatozoides procedentes de 12 epidídimos conservados durante 0 y 72 horas a 4°C. El tiempo medio de conservación en refrigeración de los epidídimos antes de la extracción de los espermatozoides fue de 36 horas.

La metodología utilizada para la obtención de los espermatozoides fue la utilizada en la experiencia 1. Sin embargo, a diferencia de la anterior esta experiencia se desarrolló fuera de la estación reproductiva, por lo que los valores obtenidos en volumen del fluido epididimario y en concentración espermática fueron inferiores a los descritos en la experiencia anterior.

El fluido epididimario presentó un volumen medio de  $597'5 \pm 86'73$   $\mu$ l y una concentración media de  $4'67 \pm 0'79 \times 10^9$  espermatozoides/ml, lo que supone que en cada muestra de fluido epididimario había un total de  $2'60 \pm 0'56 \times 10^9$  espermatozoides. La viabilidad media en estas muestras espermática recién recogidas fue de  $90'33 \pm 1'7$  %.

**6.2.1. Efecto de la incubación de los espermatozoides epididimarios en plasma seminal sobre la viabilidad espermática del semen refrigerado y congelado.**

La incubación de los espermatozoides en plasma seminal previo al proceso de congelación tuvo un efecto desigual sobre la viabilidad espermática dependiendo del animal del que procedía dicho plasma. Así, cuando se analizó la viabilidad en las muestras diluidas en medio de congelación y refrigeradas a 4°C durante 30 min (como paso previo antes de la congelación) se observó que la incubación en presencia del PS procedentes de los sementales A y F no modificó el porcentaje de células viables en comparación con sus respectivos grupos control (Tabla 6.6  $p > 0.05$ ). Sin embargo, la incubación en presencia del PS de los animales O y U produjo una reducción de la viabilidad espermática (Tabla 6.6  $p < 0.05$ ).

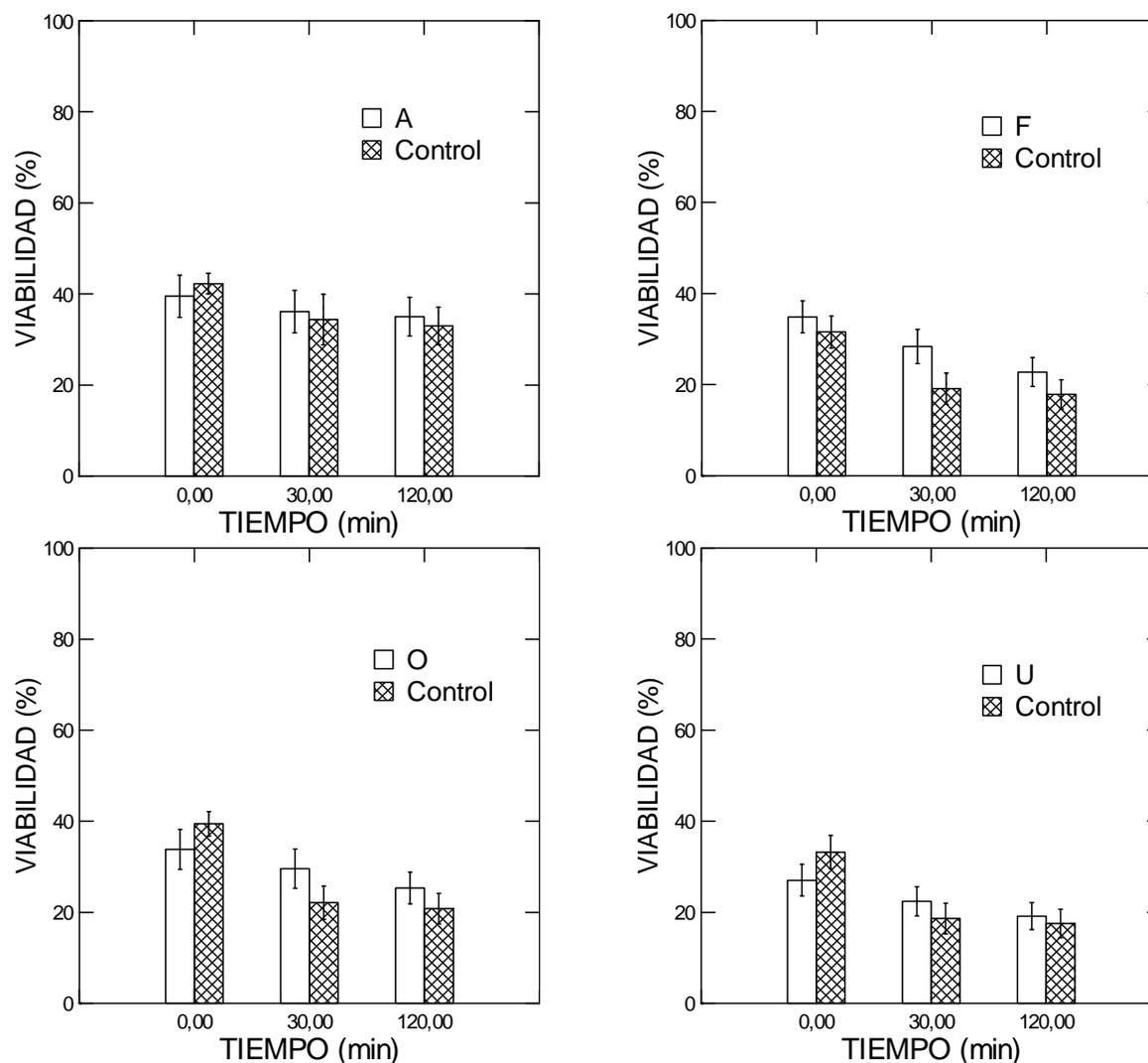
**Tabla 6.6.** Viabilidad de los espermatozoides de epidídimo incubados a 4°C durante 30 minutos con PS procedente de 4 sementales

Donante de Plasma	Epidídimo (n)	Viabilidad	Viabilidad	P - value
		control	Plama seminal	
<b>A</b>	4	91,25±0,31	89,00±1,56	0.16
<b>F</b>	11	85,55±1,51	83,50±1,78	0.26
<b>O</b>	9	88,17±1,11 <sup>a</sup>	82,78±2,44 <sup>b</sup>	0.04
<b>U</b>	11	85,50±1,54 <sup>a</sup>	80,68±1,83 <sup>b</sup>	0.02

<sup>a,b.</sup> en la misma fila indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

De igual modo se analizó el efecto de la incubación con plasma seminal sobre la viabilidad espermática de los espermatozoides de epidídimo congelados-descongelados a los 0, 30 y 120 minutos tras la descongelación. La adición de PS procedente del semental F supuso una mejora en el porcentaje de espermatozoides viables (Figura 6.5 y Tabla 6.7,  $p=0.01$ ). El PS de los sementales A, O y U no produjo mejoras en cuanto a la viabilidad de estas muestras frente a los respectivos controles (Figura 6.5 y Tabla 6.7,  $p > 0.05$ ).

**Figura 6.5.** Viabilidad espermática de muestras congeladas-descongeladas tras haber sido tratadas en presencia o ausencia (control) de plasma seminal procedente de 4 sementales (A, F, O y U)

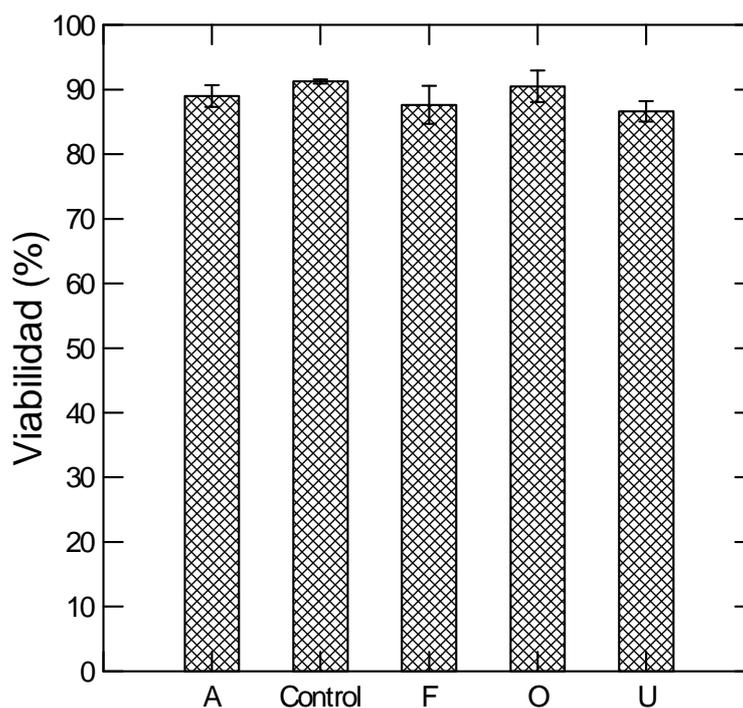


**Tabla 6.7.** Fuentes de variación en modelo ANOVA de 2 vías, valores de probabilidad

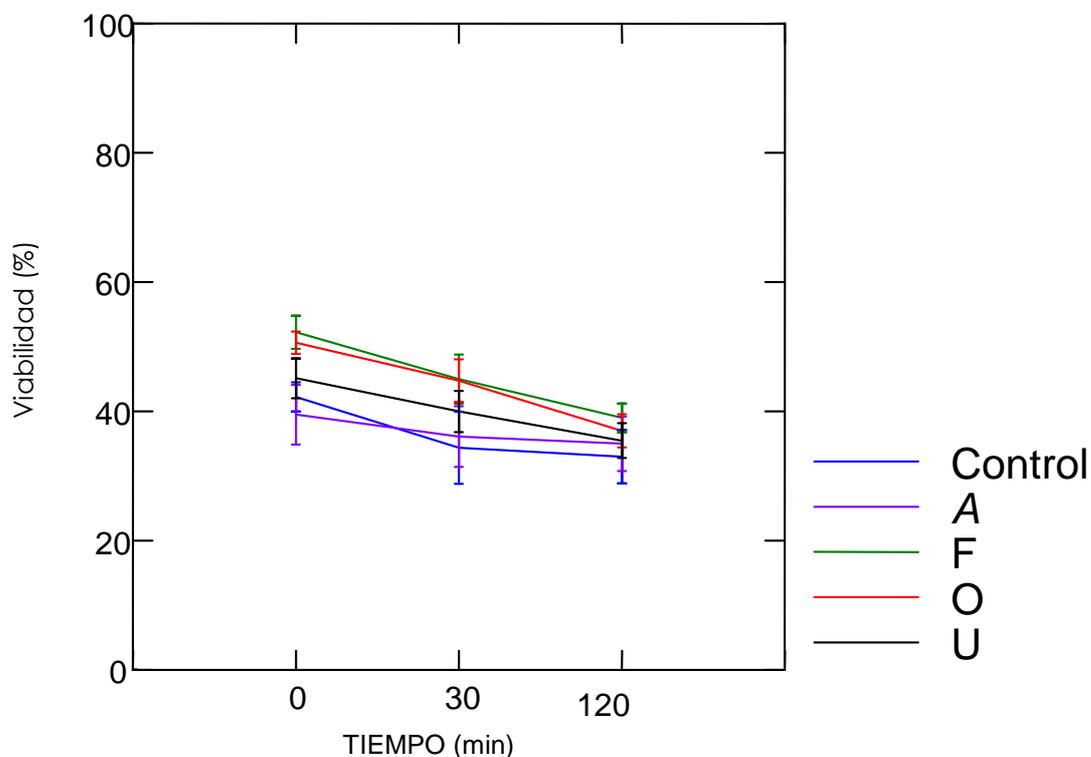
Semental (n° réplicas)	Tratamiento	Tiempo incubación	Interacción
A (4)	0.92	0.21	0.81
F (11)	0.04	<0.01	0.66
O (9)	0.47	<0.01	0.16
U (11)	0.92	<0.01	0.27

Cuando analizamos las muestras de fluido epididimario de 4 replicados donde fue posible utilizar las muestras espermáticas con plasma seminal de los cuatro sementales, encontramos que no existían diferencias entre grupos con relación a la viabilidad tras la dilución en presencia o ausencia de plasma seminal (Figura 6.6,  $p>0.05$ ). Sin embargo, al estudiar la viabilidad en las muestras congeladas se observa que el plasma seminal de los sementales F y O mejoran la viabilidad post descongelación en comparación con la muestra control y a la que se le adicionó PS del semental A (Figura 6.7,  $p<0.05$ ). Mientras que el plasma seminal de los otros los sementales A y U no modificó los valores de la viabilidad post-descongelación comparada con el control (Figura 6.7,  $p>0.05$ ).

**Figura 6.6.** Viabilidad espermática de muestras diluidas en medio de congelación y mantenidas a 4°C durante 30 min tras haber sido tratadas en presencia o ausencia (control) de plasma seminal procedentes de 4 sementales



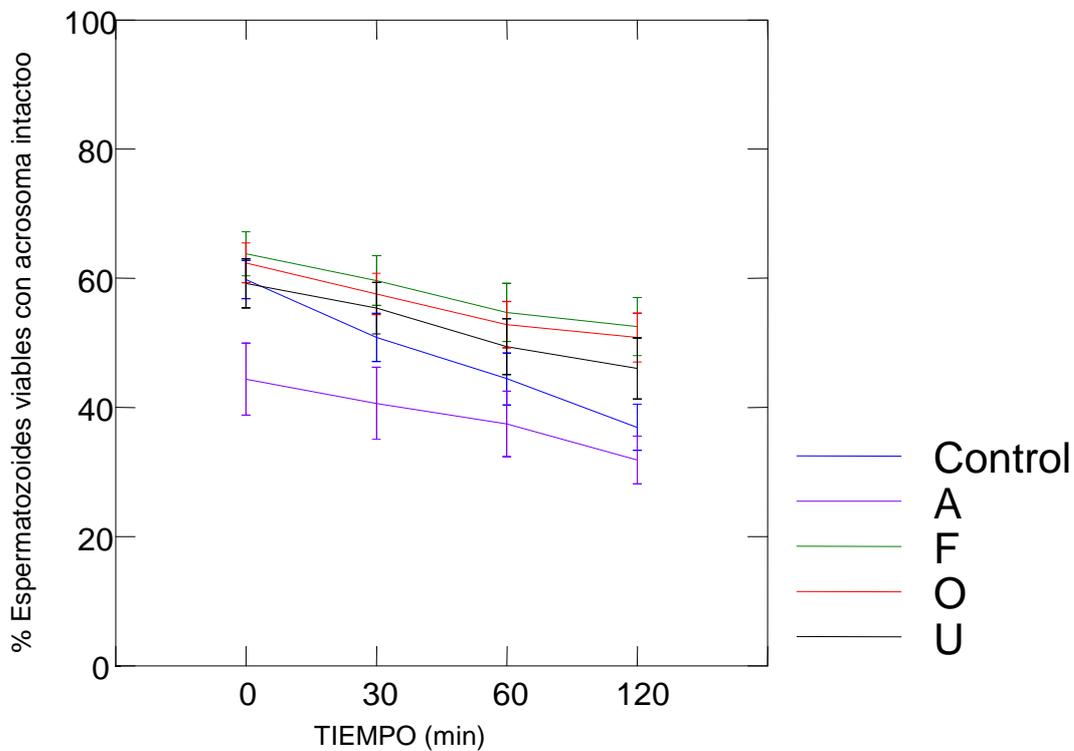
**Figura 6.7.** Viabilidad espermática de muestras congeladas-descongeladas tras haber sido tratadas en presencia o ausencia (control) de plasma seminal procedentes de 4 sementales



**6.2.2. Efecto de la incubación de los espermatozoides epididimarios en plasma seminal sobre el estado acrosomal y la viabilidad espermática del semen congelado-descongelado.**

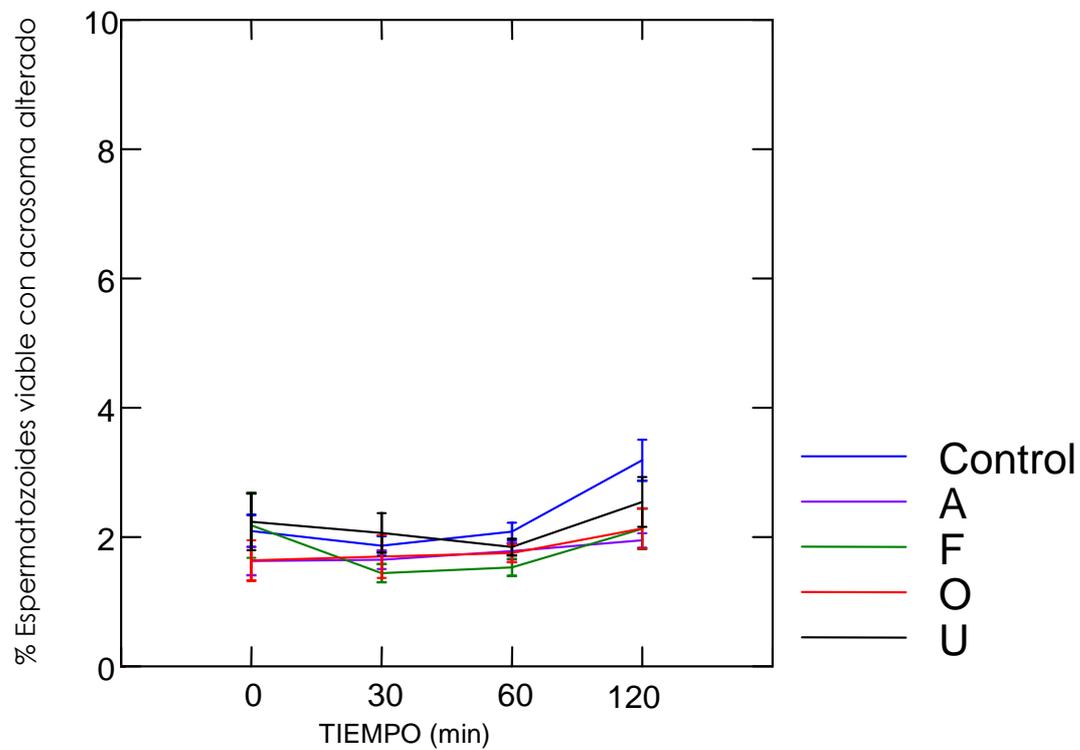
Los parámetros de viabilidad de las muestras congeladas-descongeladas de todos los grupos estudiados decrecieron a lo largo del tiempo post-descongelación ( $p < 0.01$ ). Las muestras que estuvieron incubadas en presencia de plasma seminal de los sementales F y O mostraron valores superiores en viabilidad y porcentaje de células viables con el acrosoma intacto que el control (Figura 6.8,  $p < 0.02$ ). Mientras que las muestras incubadas con plasma seminal del semental U mostraron resultados similares al control (Figura 6.8,  $p = 0.43$ ) y la incubación con plasma del semental A supuso una disminución del porcentaje de célula viables con acrosoma intacto (Figura 6.8,  $p = 0.05$ ).

**Figura 6.8.** Evolución del porcentaje de espermatozoides viables con acrosoma intacto a lo largo del tiempo. Muestras congeladas en presencia de plasma seminal procedente de 4 sementales



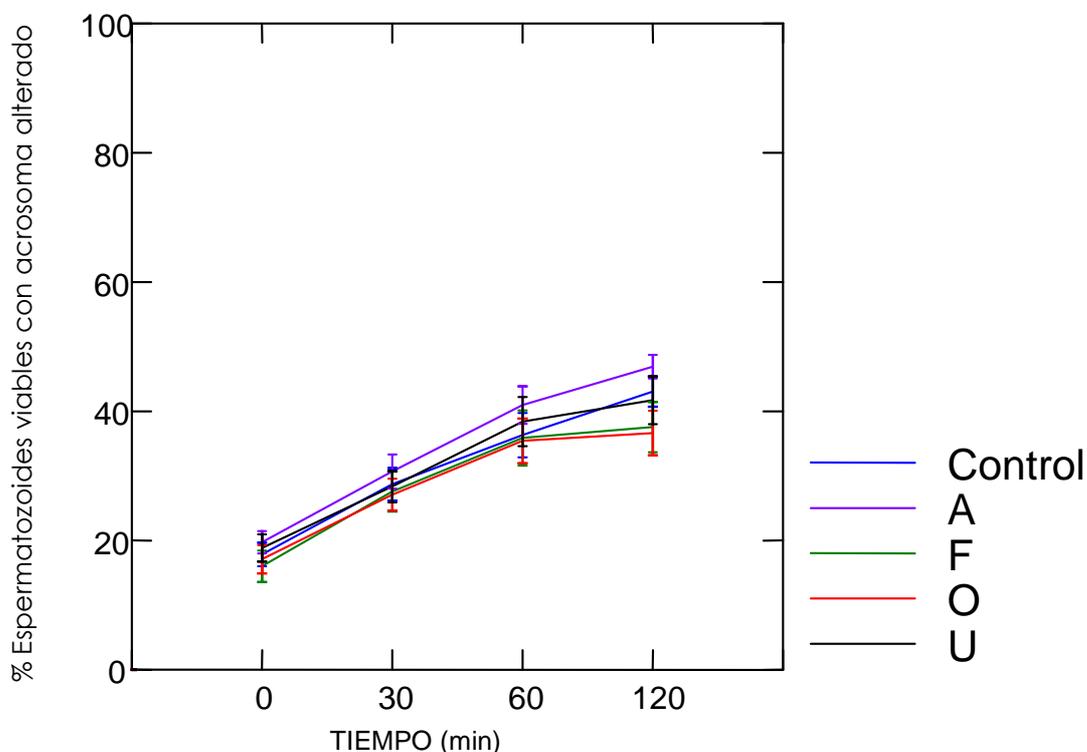
Cuando se analiza el porcentaje de células viables con acrosoma alterado, observamos por una parte que varía ligeramente a lo largo del tiempo de estudio (Figura 6.9,  $p=0.04$ ) y por otra parte observamos que todas las muestras incubadas en presencia de plasma seminal (A, F, O y U) presentan un porcentaje inferior que el control (Figura 6.9,  $p<0.01$ ).

**Figura 6.8.** Evolución del porcentaje de espermatozoides viables con acrosoma alterado a lo largo del tiempo. Muestras congeladas en presencia de plasma seminal procedente de 4 sementales



Quando analizamos el total de espermatozoides con alteración del acrosoma (independientemente de ser clasificados como vivos o muertos), observamos como aumenta su valor a lo largo del tiempo (Figura 6.9,  $p < 0.01$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias en los valores de los diferentes grupos experimentales (Figura 6.9,  $p = 0.18$ ).

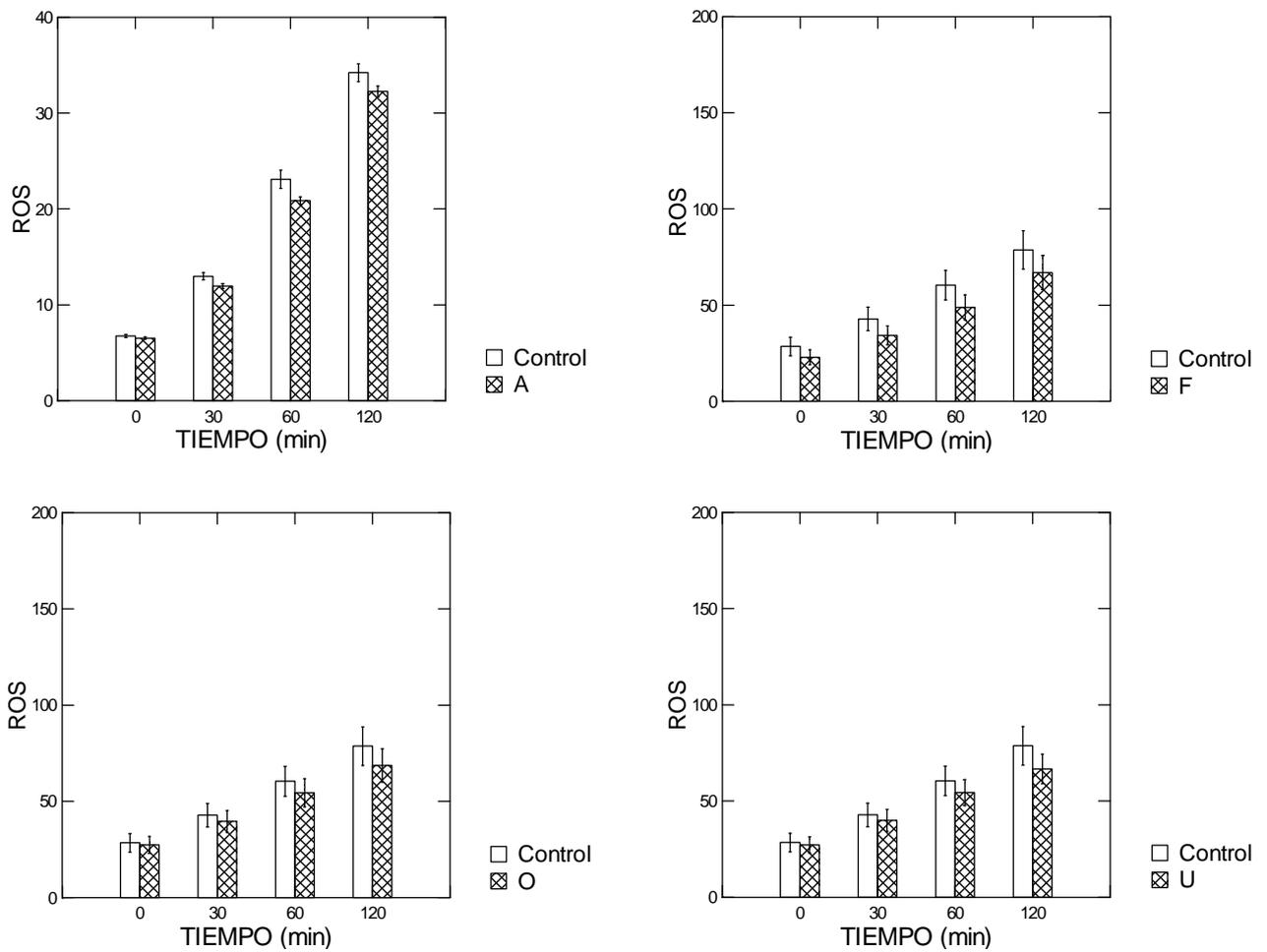
**Figura 6.9.** Evolución del porcentaje de espermatozoides con acrosoma alterado (viables y no viables) a lo largo del tiempo. Muestras congeladas en presencia de plasma seminal procedente de 4 sementales



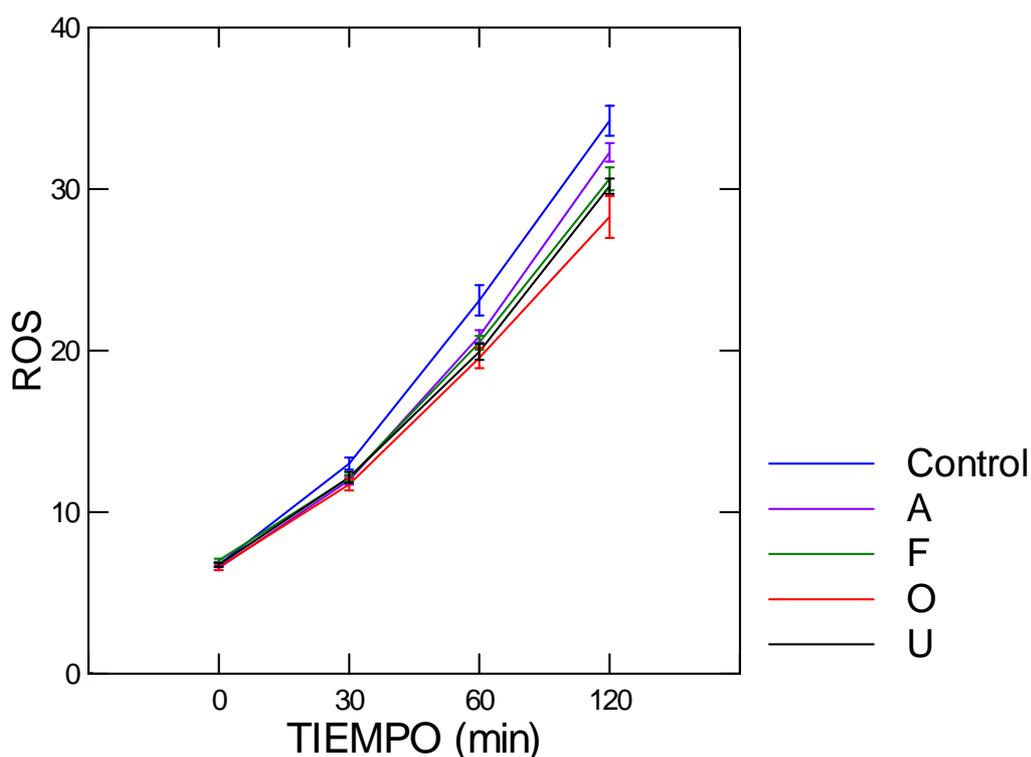
### 6.2.3. Efecto de la incubación de los espermatozoides epididimarios en plasma seminal sobre la generación de ROS

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) medida en unidades de fluorescencias (UF) se vio afectada por el tiempo de incubación (Figuras 6.10 y 6.11,  $p < 0.01$ ), con un incremento en la generación de ROS a lo largo del tiempo. La incubación en presencia de plasma seminal supuso una reducción significativa en la generación de ROS en todos los casos estudiados (Figuras 6.10 y 6.11,  $p < 0.01$ ). Cuando analizamos las muestras seminales incubados con plasma seminal procedente de todos los sementales, confirmamos que los espermatozoides epididimarios incubados con plasma seminal redujeron la generación de ROS en comparación con los espermatozoides no incubados con plasma seminal (control) (Figura 6.11,  $p < 0.01$ ) y a su vez, el grupo O genera menos ROS que los grupos A y F (Figura 6.11,  $p < 0.05$ ).

**Figura 6.10.** Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en muestras congeladas-descongeladas tras haber sido incubados con plasma seminal procedente de 4 sementales (A, F, O y U)



**Figura 6.11.** Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en muestras congeladas-descongeladas tras haber sido incubados con plasma seminal procedente de 4 sementales (A, F, O y U)



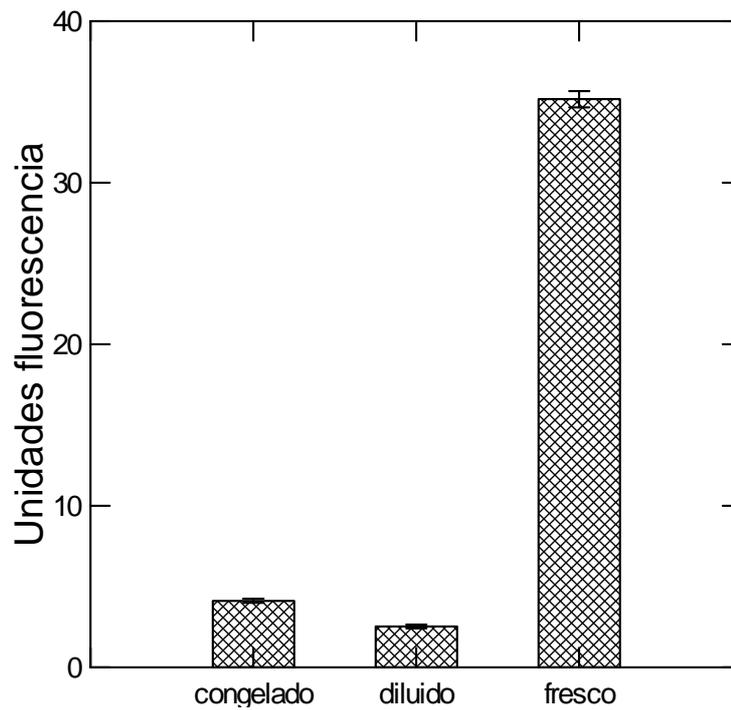
#### **6.2.4. Efecto de la incubación de los espermatozoides epididimarios en plasma seminal sobre la condensación de cromatina.**

Con el proceso de refrigeración y congelación se produjo una gran hipercondensación con reducción de la entrada de IP y reducción del nivel de la fluorescencia roja detectada por citometría de flujo. Así los valores de condensación de la cromatina pasaron de  $35'17 \pm 0'49$  UAFs de las muestras frescas recién obtenidas a  $2'53 \pm 0'12$  y  $4'12 \pm 0'13$  en las muestras refrigeradas y congeladas-descongeladas (Figura 6.12,  $p < 0.01$ ).

En las muestras diluidas se observaron diferencias en el grado de condensación de acuerdo al tipo de plasma seminal utilizado. Así el uso de plasma seminal de los sementales A y F supuso valores de condensación superior al control (valor de

fluorescencia menor) (Tabla 6.8,  $p < 0.01$ ). Mientras que no se detectaron diferencias entre grupos para las muestras congeladas-descongeladas (Tabla 6.8,  $p = 0.08$ ).

**Figura 6.12.** Condensación de la cromatina de los espermatozoides de epidídimo de caballo recién obtenidos (fresco), diluidos 30 min a 4°C en el medio de congelación y congelado-descongelados



**Tabla 6.8.** Condensación de la cromatina de los espermatozoides de epidídimo de caballo diluido 30 min a 4°C en el medio de congelación y congelado-descongelados. Muestras incubadas en presencia de plasma seminal. Unidades arbitrarias de fluorescencia

	Diluido	Descongelado
Control	3'29±0'31 <sup>a</sup>	3'63±0'28
Alegre	2'11±0'22 <sup>b</sup>	3'66±0'39
Faraón	2'03±0'13 <sup>b</sup>	2'74±0'19
Ojeado	2'66±0'27 <sup>ab</sup>	3'16±0'27
Udón	2'43±0'27 <sup>ab</sup>	3'16±0'25
P-value	0'01	0'08

<sup>a,b</sup> en la misma columna indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

### 6.3. Experiencia 3. Estudio de las características y composición del plasma seminal

#### 6.3.1 Capacidad antioxidantes total y concentración de proteínas totales del plasma seminal

En la tabla 6.9 queda reflejada la capacidad antioxidante y la concentración de proteínas totales que presentan las muestras de plasma seminal de los machos utilizados en este trabajo. Se observan diferencias entre los cuatro animales estudiados en los valores de capacidad antioxidante, mientras que para la concentración de proteínas las muestras de A y U presentan las concentraciones más reducidas, O una posición intermedia y F tiene los valores más elevados (Tabla 6.9,  $p < 0.05$ ).

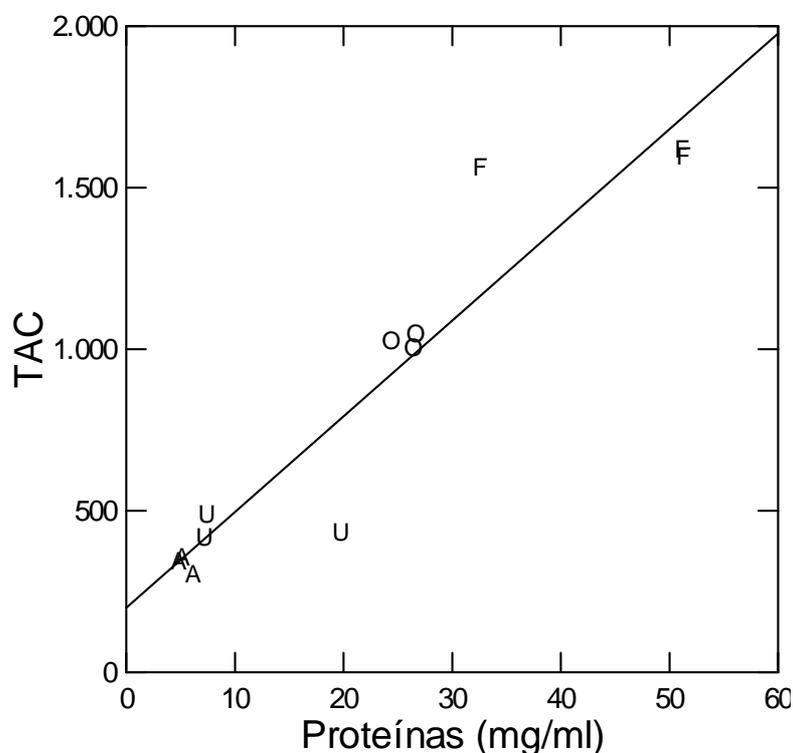
**Tabla 6.9.** Capacidad antioxidantes total y concentración proteica del plasma seminal de cuatro sementales (A, F, O y U).

Semental	Capacidad antioxidante Equivalentes L-Ascórbico (nmol/ml <sup>-1</sup> )	Proteínas totales (µg/µl)
A	325'19±23'33 <sup>a</sup>	5'39±0'41 <sup>a</sup>
F	1'591'98±16'09 <sup>b</sup>	45'40±4'43 <sup>b</sup>
O	1'024'11±11'95 <sup>c</sup>	25'25±0'67 <sup>c</sup>
U	444'75±21'07 <sup>d</sup>	11'28±4'15 <sup>a</sup>

a,b,c,d en la misma columna indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

Cuando se representó gráficamente la relación entre concentración de proteínas y la capacidad antioxidante total del plasma seminal (Figura 6.13) se observó una clara relación lineal con un índice de correlación de Pearson  $r = 0.94$  ( $p < 0.01$ ).

**Figura 6.13.** Capacidad antioxidantes total y concentración proteica del plasma seminal de cuatro sementales (A, F, O y U)



### 6.3.2. Ácidos grasos presentes en el plasma seminal

En la tabla 6.10 se muestran la composición en ácidos grasos que presentan el plasma seminal procedentes de tres de los machos empleados en este trabajo (A, F y O), así como el valor medio de los mismos. Al disponer de una única medición por animal no pudimos aplicar un análisis estadístico de la varianza a los datos obtenidos, por lo que únicamente haremos una descripción de los resultados más destacados.

Los ácidos grasos saturados (SFA) supone la mayor parte de los ácidos grasos presentes en el plasma seminal (62'88%), y entre ellos el ácido palmítico (C16:0) y el esteárico (C18:0) son los componentes principales y suponen el 85% de los SFA (tabla 6.10). Por otra parte los ácidos grasos mono insaturados (MUFA) suponen un 20'38% del total de los ácidos grasos y destacan entre ellos el ácido oleico (C18:1n-9), que representa el 60% de los MUFA y en menor medida el ácido vaccínico (C18:1n-7). Finalmente los ácidos grasos poli insaturados (PUFA) están en una proporción del 16'74% , donde los ácidos  $\omega$ -6 suponen un 9'57% y destaca entre ellos la presencia del

ácido eicosapentanoico (c20:5n-3, EPA), mientras que los ácidos  $\omega$ -3 representan un 7'17%, siendo el ácido Dihomogammalinoleico (C20:3n-6, DGLA) el componente más importante cuantitativamente.

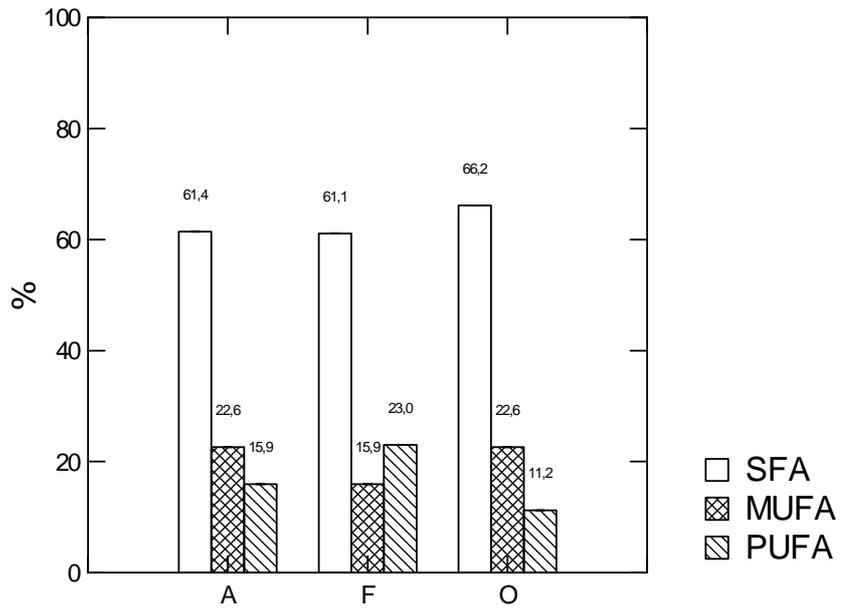
**Tabla 6.10.** Distribución porcentual de los ácidos grasos del plasma seminal procedentes de tres sementales (A, F y O)

Ácidos grasos		Valor medio	A	F	O
Mirístico	C14:0	5'78	6'01	7'63	3'69
Palmítico	C16:0	34'63	35'01	30'94	37'93
Estearico	C18:0	19'21	17'60	18'71	21'32
Araquídico	C20:0	1'55	1'37	1'80	1'47
Behénico	C22:0	1'73	1'43	2'00	1'76
Saturados (SFA)		<b>62'88</b>	<b>61'42</b>	<b>61'07</b>	<b>66'16</b>
Palmitoleico	C16:1n-7	2'15	0'00	2'41	4'04
Oleico	C18:1n-9	12'91	15'95	9'79	12'98
Vaccénico	18:1n-7	3'81	4'93	2'38	4'10
Eicosanoico	20:1n-9	0'60	0'95	0'32	0'53
Erúcico	22:1n-9	0'13	0'00	0'00	0'39
Nervónico	24:1n-9	0'79	0'80	1'01	0'55
Mono insaturados (MUFA)		<b>20'38</b>	<b>22'64</b>	<b>15'91</b>	<b>22'59</b>
Linoleico (LA)	18:2n-6	4'12	4'48	4'40	3'49
Eicosadienoico	20:2n-6	0'55	0'85	0'42	0'36
Dihomogammalinoleico (DGLA)	20:3n-6	3'73	1'68	8'66	0'84
Araquidónico (AA)	20:4n-6	0'75	1'07	0'92	0'27
Docosatetraenoico	22:4n-6	0'42	0'58	0'47	0'21
Omega 6 ( $\omega$ -6 PUFA )		<b>9'57</b>	<b>8'67</b>	<b>14'87</b>	<b>5'17</b>
$\alpha$ -Linoleico (ALA)	18:3n-3	0'45	0'64	0'31	0'42
Estearidónico (SDA)	18:4n-3	0'30	0'25	0'36	0'28
Eicosatrienoico (ETE)	20:3n-3	0'49	0'52	0'51	0'43

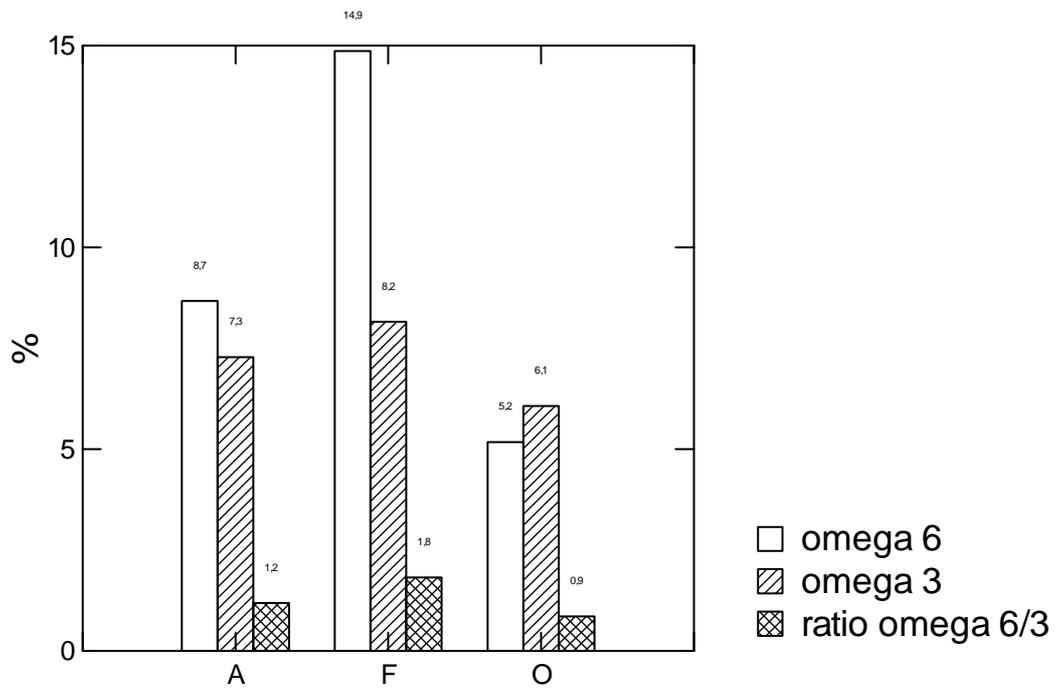
Ácidos grasos		Valor medio	A	F	O
Eicosapentanoico (EPA)	20:5n-3	4'48	4'49	5'27	3'68
Docosapentaenoico (DPA)	22:5n-3	0'49	0'29	0'31	0'87
Docosohexanoico (DHA)	22:6n-3	0'96	1'09	1'40	0'39
Omega 3 ( $\omega$ -3 PUFA)		<b>7'17</b>	<b>7'28</b>	<b>8'15</b>	<b>6'07</b>
Poliinsaturados (PUFA)		<b>16'74</b>	<b>15'94</b>	<b>23'02</b>	<b>11'24</b>
Ratio $\omega$ -6/ $\omega$ -3		1'29	1'19	1'82	0.85
Ratio SFA/PUFA		4'13	3.85	2'65	5'88

Cuando analizamos los perfiles de ácidos grasos de las muestras de plasma seminal de los tres sementales estudiados, observamos diferencias entre ellos (Figura 6.14 y Tabla 6.10). Por una parte el plasma seminal de O presenta mayor proporción de ácidos grasos saturados que A y F. Mientras que el plasma seminal de F presenta una menor proporción de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) que las muestras de A y O. A su vez la muestra de F presenta un mayor porcentaje de ácidos poli insaturados (PUFA) que A y O. Lo que supone que el ratio SFA/PUFA que presenta la muestra de F es sensiblemente inferior a los otros animales (Tabla 6.10). Al analizar en detalle la distribución porcentual de ácidos grasos poli insaturados (PUFA), observamos que F presenta mayores valores para los PUFA principalmente por tener aumentado los ácidos grasos del tipo omega-6, mientras que los valores de omega-3 son similares a los de los sementales A y O (Figura 6.15 y Tabla 6.10). Por lo tanto el ratio entre omega 6/omega 3 es sensiblemente mayor para F que para A y O.

**Figura 6.14.** Distribución porcentual de los ácidos grasos saturados (SFA), mono insaturados (MUFA) y poli insaturados (PUFA) del plasma seminal procedente de tres sementales (A, F y O)



**Figura 6.15.** Distribución porcentual de los ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) del plasma seminal procedente de tres sementales (A, F y O)

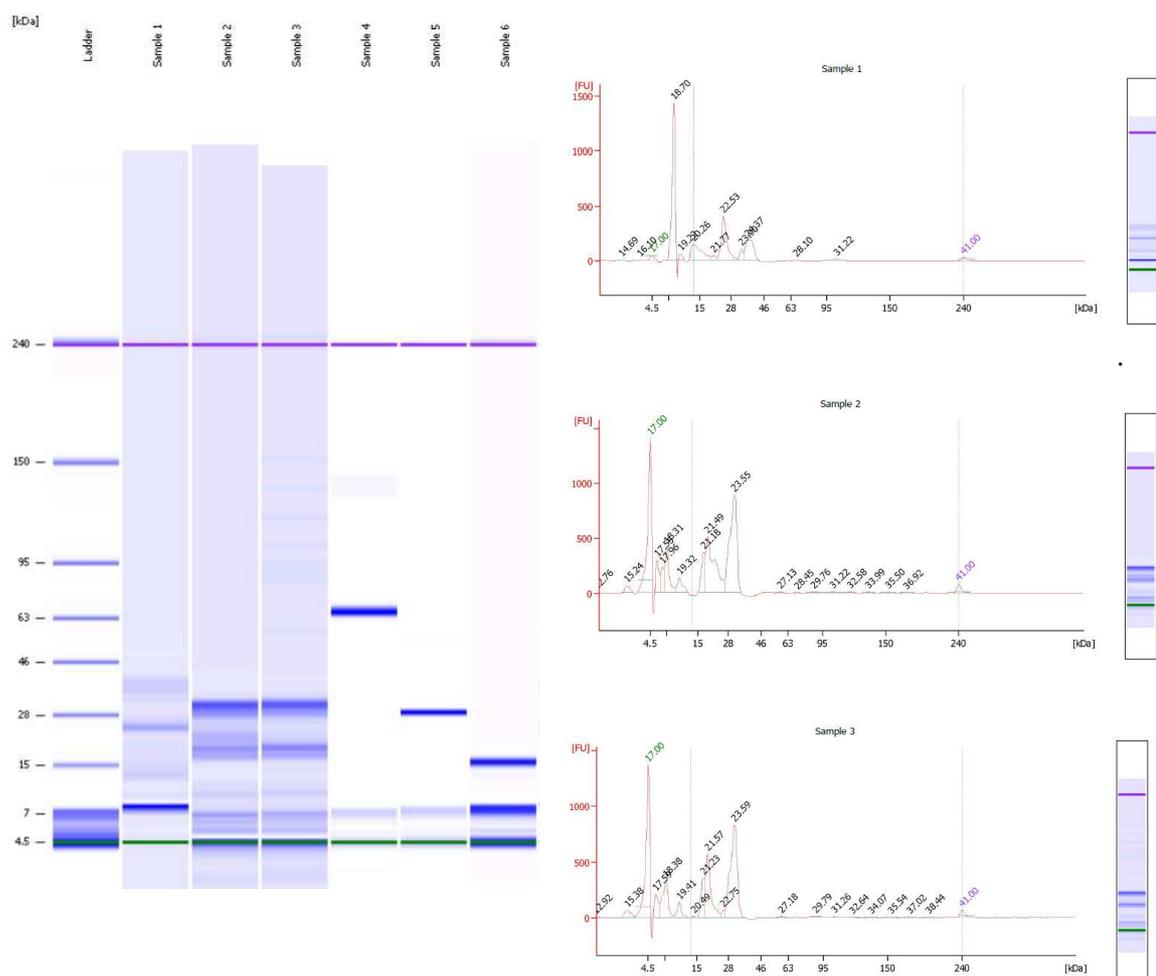


### 6.3.3. Composición proteica del plasma seminal (electroforesis 1D)

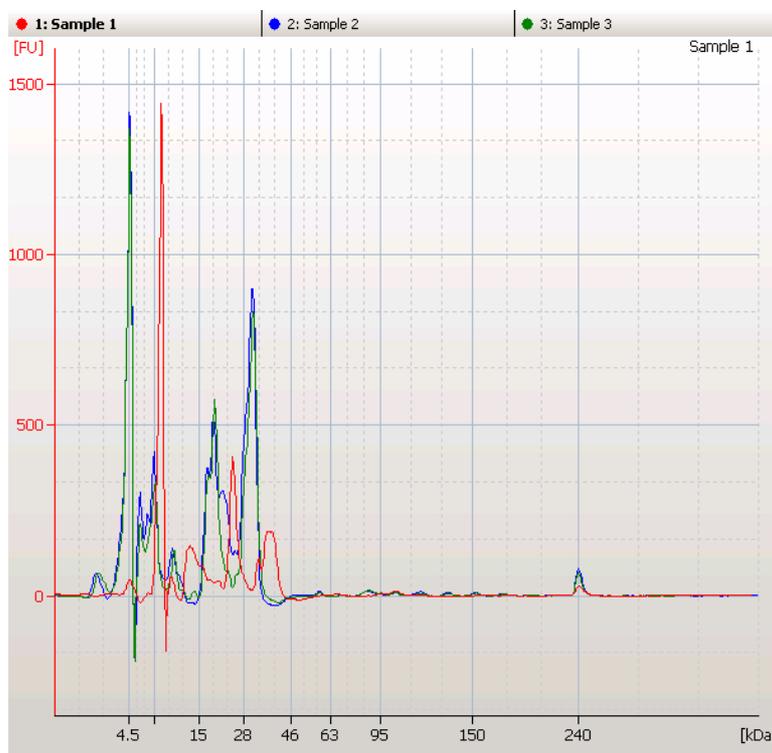
Mediante el empleo de un bioanalizador de electroforesis capilar se evaluó la distribución de las diferentes proteínas presentes en el plasma seminal de los tres sementales estudiados A, F y O.

Al comparar los electroferogramas de las muestras se puso de manifiesto una diferente distribución de las proteínas entre la muestra A y las muestras F y O (Figuras 6.16 y 6.17). En especial destacan los cambios en las proteínas de peso molecular próximos a 4.5 KDa, entre 15 y 28 KDa y próximos a 30 KDa.

**Figura 6.16.** Electroforesis 1D y electroferogramas de muestras de plasma seminal procedente de tres sementales (A, F y O). Muestra A: 1 . Muestra F: 2. Muestra O: 3 . Control BSA: 4. Control CA: 5. Control CytC: 6



**Figura 6.17.** Electroferogramas de las muestras de plasma seminal procedente de tres sementales (A, F y O). Muestra A: 1 . Muestra F: 2. Muestra O: 3



#### 6.3.4. Electroforesis bidimensional diferencial (sistema 2D-DIGE)

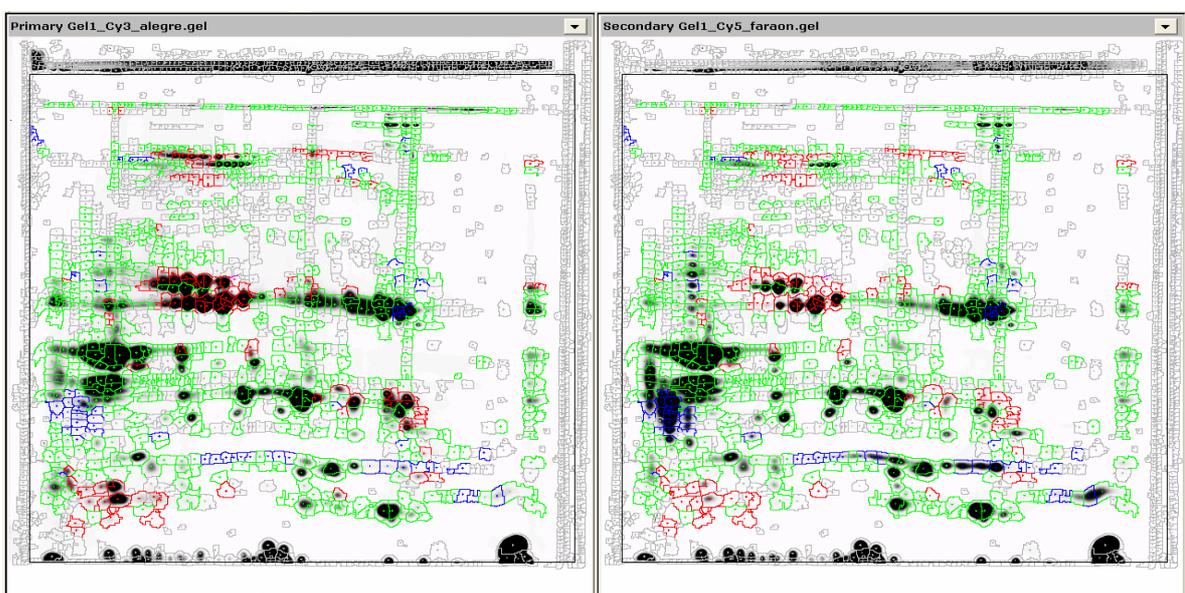
Mediante la técnica de electroforesis bidimensional diferencial (sistema 2D-DIGE) se hizo una comparación directa en un mismo gel bidimensional de las proteínas presentes en el plasma seminal procedente de dos sementales y permite detectar la expresión diferencial de las proteínas presentes. Al disponer de muestras de plasma seminal de tres sementales se pudo realizar la comparación por pares en tres gels.

##### **Estudio diferencial proteínas del plasma seminal del semental A vs semental F**

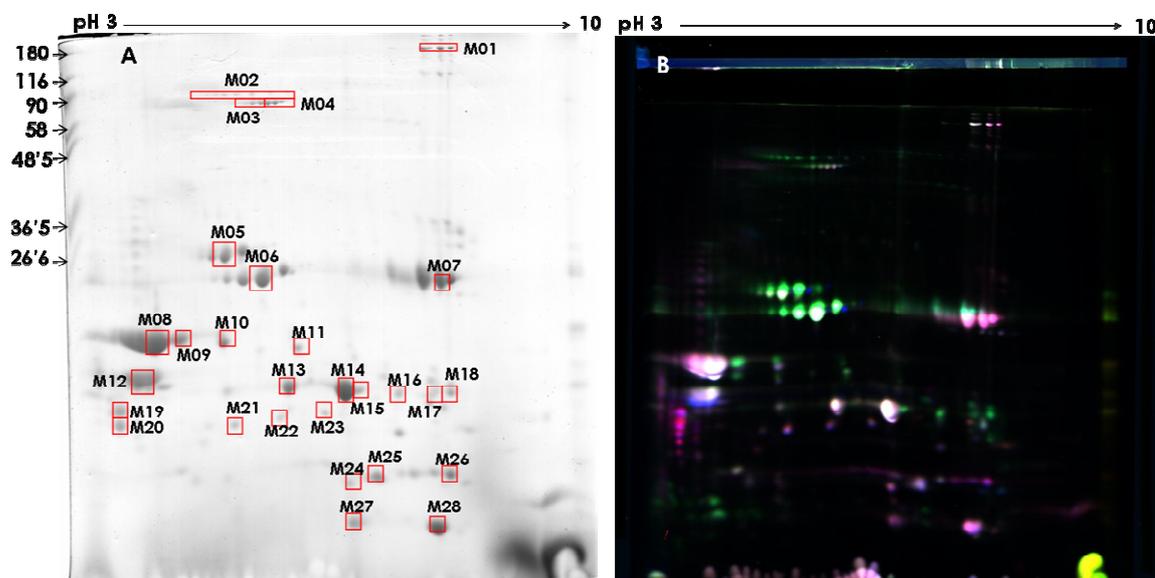
En el primer gel se compararon las proteínas del plasma seminal de los sementales A y F (Figuras 6.18 y 6.19). Las señales fluorescentes de color verde indican coincidencia en las proteínas de ambas muestras mientras que la señal fluorescente azul y roja indican diferencias en las proteínas de las muestras comparadas. Las imágenes fueron procesadas y se analizó la discrepancia entre las proteínas. Se realizó el análisis de expresión diferencial con la ayuda del programa Decyder 5.01 (GE Healthcare) y cuyo resultado se muestra en la tabla 6.11, con un total de 26 proteínas

que no aparecen en la muestra de A al compararla con la muestra F (down, ratio  $<0$ ,  $p < 0.05$ ), y 22 proteínas que están presentes en A y no en F (up, ratio  $>0$ ,  $p < 0.05$ ). Del total de proteínas detectadas se seleccionaron un total de 28 puntos o spots para el proceder a la identificación de las proteínas presentes que denominamos M1-M28 (Figura 6.19).

**Figura 6.18.** Análisis de imagen de los geles bidimensionales correspondientes al estudio comparativo entre el plasma seminal de los sementales **A y F**. Los spots marcados en rojo y azul indican expresión diferencial



**Figura 6.19.** Análisis de imagen de los geles bidimensionales correspondientes al estudio comparativo entre el plasma seminal de los sementales A y F. A) Gel 2D con tinción de azul de Coomassie donde está indicada la distribución de los puntos correspondiente a las proteínas seleccionadas y B) Gel 2D iluminado con fluorescencia



**Tabla 6.11.** Proteínas del plasma seminal que aparecen expresadas de forma diferencial en los sementales A y F, ordenadas por peso molecular (Mw) y punto isoelectrico (pI)

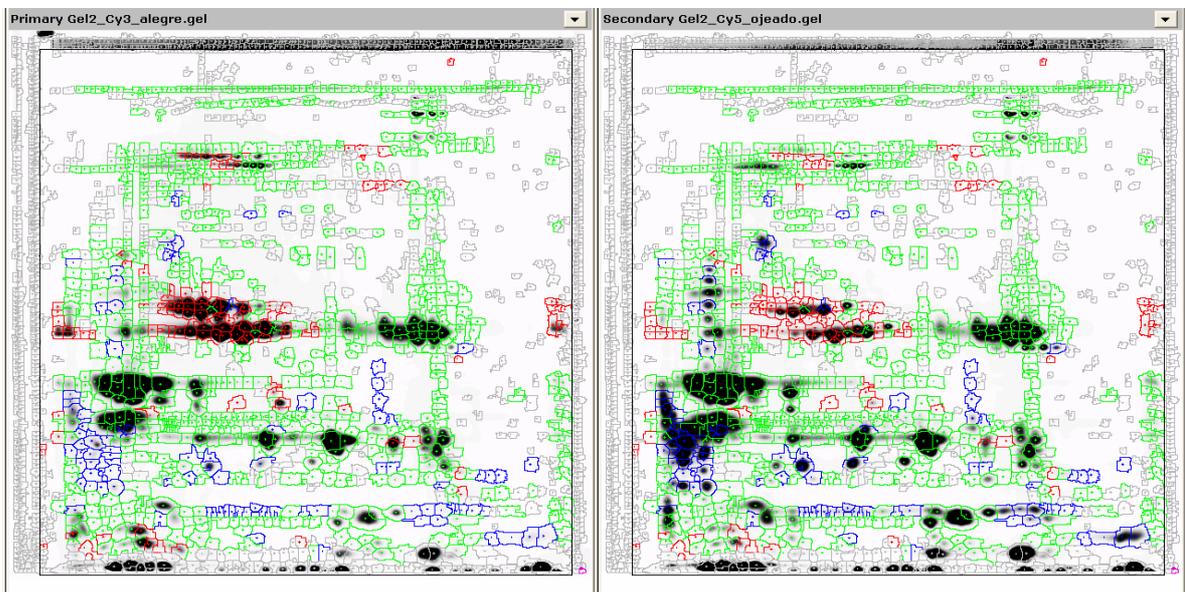
Mw	pI	Ratio	p-value
3	6'8	-2'46	0'036
3	8	-2'31	0'0051
5	4'2	-1'6	0'032
5	6'8	-2'22	0'0053
5	7'2	-1'64	0'0087
5	8'2	-5'86	0'0012
6	3'8	-1'35	0'038
7	3'2	-21'08	0'0011
7	4'95	-2'33	0'0014
8	5'8	-1'6	0'011
8	6'32	-1'95	0'0067
8	6'63	-1'46	0'034
8	6'8	-1'55	0'034
10	3'57	-1'22	0'0036
13	4'8	-1'14	0'041
19	3'53	-2'55	0'0093
19	8'11	-1'4	0'021
20	8'13	-3'29	0'0042
22	8'11	-3'3	0'0017

<b>Mw</b>	<b>pI</b>	<b>Ratio</b>	<b>p-value</b>
28	3'54	-3'44	0'0087
31	3'54	-2'47	0'0037
34	3'55	-3'11	0'0079
41	3,'55	-1'68	0'0039
96	5'6	-1'04	0'012
150	8'22	-2'31	0'0039
150	8'4	-2'87	0'0053
8	7	3'76	0'00081
8	8	2'66	0'011
8	8'24	7'93	0'0011
9	6'96	1'66	0'0026
9	8'23	6'71	0'0044
13	5'91	2'12	0'0027
14	4'1	2'26	0'024
14	4'78	2'96	0'02
22	5'43	2'58	0'0008
23	5'35	2'86	0'00043
23	5'45	2'69	0'0023
24	5'87	4'01	0'015
25	5'48	4'64	0'0003
27	4'86	1'56	0'0015
28	5'3	7'17	7'90E-05
93	5'26	3'13	0'0014
93	5'36	2'15	0'0011
93	5'49	1'34	0'0016
94	5'81	2'11	0'0008
100	4'82	7'92	0'0003
100	4'95	6'68	0'00016
100	5'61	3'11	0'0041

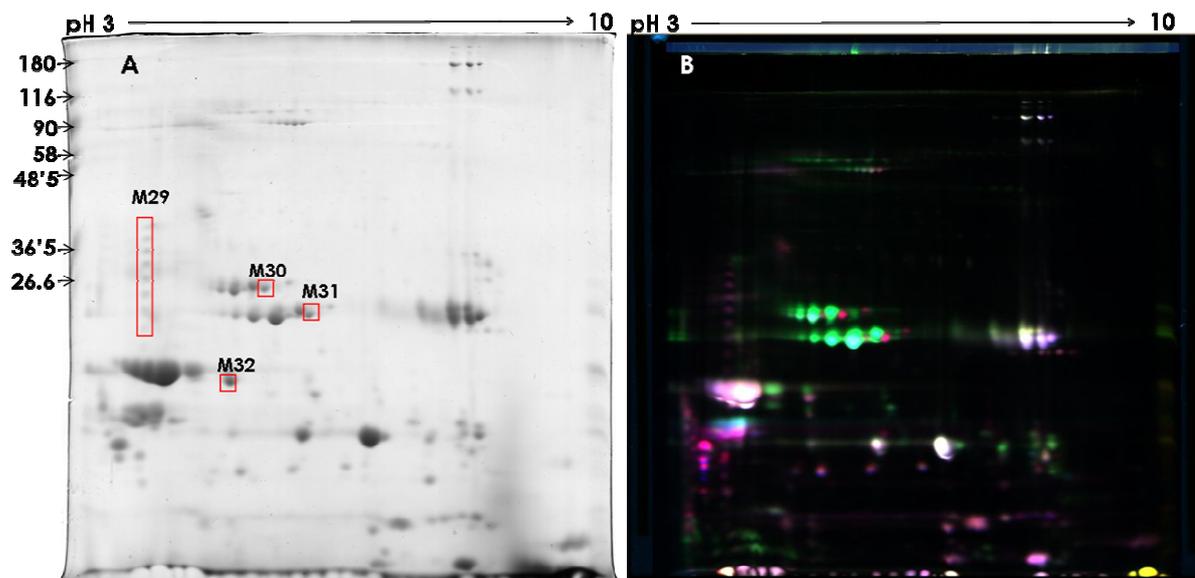
### ***Estudio diferencial proteínas del plasma seminal del semental A vs semental O***

Se detectaron los puntos donde había diferencias entre el plasma seminal del semental O frente al A. (Tabla 6.12 y Figuras 6.20 y 6.21). Del total de proteínas detectadas se seleccionaron un total de 4 puntos o spots adicionales para el proceder a la identificación de las proteínas presentes (M29 –M32; Figura 6.21).

**Figura 6.20.** Análisis de imagen de los geles bidimensionales correspondientes al estudio comparativo entre el plasma seminal de los sementales A y O. Los spots marcados en rojo y azul indican expresión diferencial



**Figura 6.21.** Análisis de imagen de los geles bidimensionales correspondientes al estudio comparativo entre el plasma seminal de los sementales O y A. A) Gel 2D con tinción de azul de Coomassie donde está indicada la distribución de los puntos correspondiente a las proteínas seleccionadas y B) Gel 2D iluminado con fluorescencia



**Tabla 6.12.** Proteínas del plasma seminal que aparecen expresadas de forma diferencial en los sementales O y A, ordenadas por peso molecular (Mw) y punto isoeléctrico (pI)

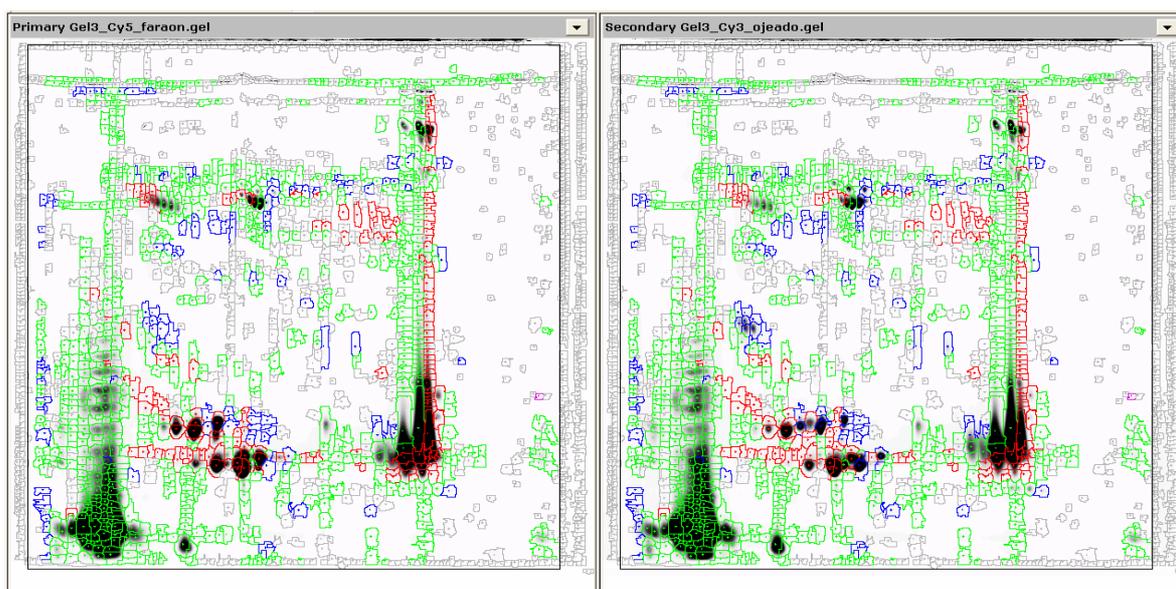
<b>Mw</b>	<b>pI</b>	<b>Ratio</b>	<b>p-value</b>
6	3'8	-1'16	0'038
8	7	-2'97	0'00081
8	8'24	-1'83	0'0011
8	8	-1'21	0'011
9	8'23	-2'48	0'0044
9	6'96	-1'55	0'0026
10	3'57	-2'3	0'0036
13	5'91	-3'89	0'0027
14	4'78	-2'14	0'02
14	4'1	-1'72	0'024
22	5'43	-8'75	0'0008
23	5'45	-8'76	0'0023
23	5'35	-8'6	0'00043
25	5'48	-14'92	0'0003
27	4'86	-4'73	0'0015
93	5'26	-6'19	0'0014
93	5'36	-4'46	0'0011
93	5'49	-2'67	0'0016
96	5'6	-1'61	0'012
100	4'82	-6'95	0'0003
100	4'95	-4'94	0'00016
100	5'61	-1'81	0'0041
3	8	1'84	0'0051
3	6'8	1,86	0'036
5	4'2	1'77	0'032
5	6'8	1'97	0'0053
5	7'2	2'14	0'0087
5	8'2	4'62	0'0012
7	4'95	2'75	0'0014
7	3'2	15'67	0'0011
7	3'2	16	0'0011
8	5'8	1'12	0'011
8	6'63	1'18	0'034
8	6'8	1'18	0'034
8	6'32	1'96	0'0067
13	4'8	1'68	0'041
19	8'11	1'7	0'021
19	3'53	2'39	0'0093
20	8'13	1'43	0'0042
22	8'11	1'43	0'0017
24	5'87	3'61	0'015
28	3'54	2'77	0'0087
28	5'3	4'13	7'90E-05
31	3'54	2'38	0'0037
34	3'55	2'94	0'0079

Mw	pI	Ratio	p-value
41	3'55	1'47	0'0039
94	5'81	2	0'0008
150	8'22	1'27	0'0039
150	8'4	1'37	0'0053

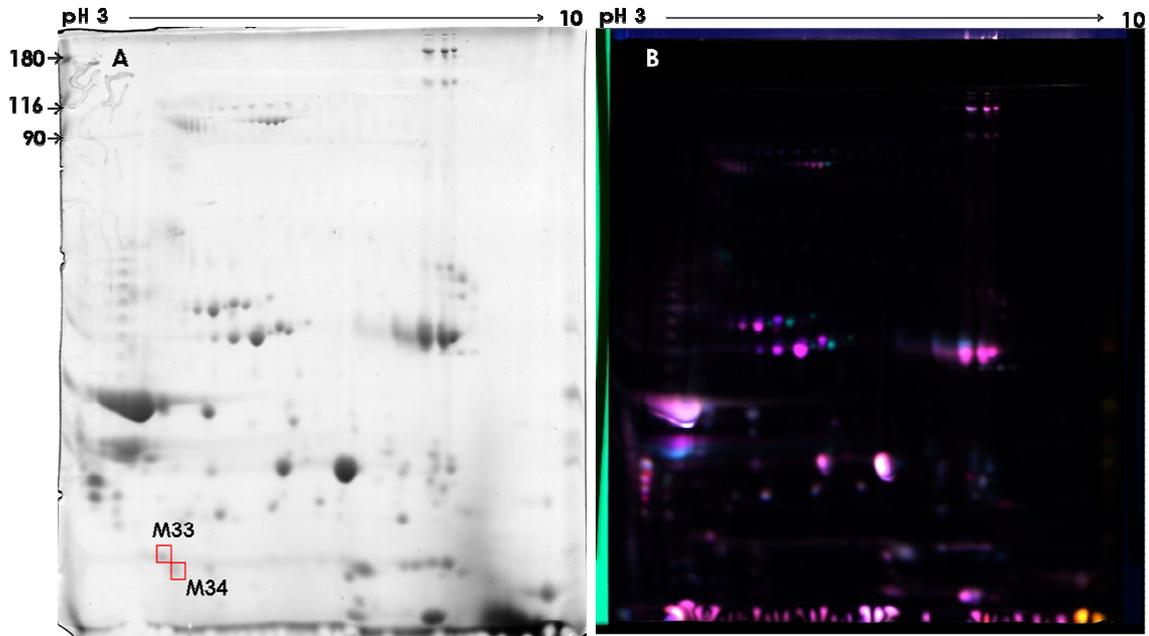
### Estudio diferencial proteínas del plasma seminal del semental F vs semental O

Se detectaron los puntos donde había diferencias entre el plasma seminal del semental F frente al O. (Tabla 6.13 y Figuras 6.22 y 6.23). Del total de proteínas detectadas se seleccionaron un total de 2 puntos o spots adicionales para proceder a la identificación de las proteínas presentes (M33 y M34, Figura 6.23).

**Figura 6.22.** Análisis de imagen de los geles bidimensionales correspondientes al estudio comparativo entre el plasma seminal de los sementales F y O. Los spots marcados en rojo y azul indican expresión diferencial



**Figura 6.23.** Análisis de imagen de los geles bidimensionales correspondientes al estudio comparativo entre el plasma seminal de los sementales F y O. A) Gel 2D con tinción de azul de Coomassie donde está indicada la distribución de los puntos correspondiente a las proteínas seleccionadas y B) Gel 2D iluminado con fluorescencia



**Tabla 6.13.** Proteínas del plasma seminal que aparecen expresadas de forma diferencial en los sementales F y O, ordenadas por peso molecular (Mw) y punto isoeléctrico (pI)

Mw	pI	Ratio	p-value
5	7'2	-1'31	0'0087
5	4'2	-1'11	0'032
7	4'95	-1'18	0'0014
7	5'64	-1'01	0'097
8	8'24	-4'34	0'0011
8	8	-2'19	0'011
8	7	-1'27	0'00081
8	6'32	-1'01	0'0067
9	8'23	-2'71	0'0044
9	3'66	-2'22	0'064
9	6'96	-1'07	0'0026
10	3'51	-2'06	0'35
13	4'8	-1'48	0'041
14	4'78	-1'38	0'02
14	4'1	-1'31	0'024
14	4	-1'1	0'072
19	8'11	-1'21	0'021
24	5'87	-14'44	0'015

<b>Mw</b>	<b>pl</b>	<b>Ratio</b>	<b>p-value</b>
28	5'3	-29'62	7'90E-05
94	5'81	-4'23	0'0008
100	5'61	-1'72	0'0041
100	4'95	-1'35	0'00016
100	4'82	-1'14	0'0003
3	8	1'26	0'0051
3	6'8	1'32	0'036
5	6'8	1'13	0'0053
5	8'2	1'27	0'0012
6	3'8	1'57	0'038
7	3'2	1'32	0'0011
7	3'2	1'59	0'0011
8	6'63	1'24	0'034
8	6'8	1'32	0'034
8	5'8	1'43	0'011
10	3'73	1'29	0'48
10	3'57	2'8	0'0036
13	5'91	1'84	0'0027
19	3'53	1'07	0'0093
20	8'13	2'3	0'0042
22	8'11	2'32	0'0017
22	5'43	3'4	0'0008
23	5'35	3	0'00043
23	5'45	3'25	0'0023
25	3'54	1'18	0'068
25	5'48	3'21	0'0003
27	4'86	3'02	0'0015
28	3'54	1'24	0'0087
31	3,54	1'04	0'0037
34	3,55	1'06	0'0079
41	3,55	1'14	0'0039
93	5,71	1'04	0'51
93	5,26	1'98	0'0014
93	5,49	1'99	0'0016
93	5,36	2'07	0'0011
96	5,6	1'67	0'012
150	7,8	1'06	0'83
150	8,22	1'82	0'0039
150	8,4	2'09	0'0053

### 6.3.5. Identificación de proteínas

Una vez analizados los 34 spots descritos en el apartado anterior fue posible identificar un total de 8 proteínas que se expresaron de forma diferente en las muestras de plasma seminal de los tres sementales estudiados. El resumen de los resultados se muestra en la tabla 6.14.

#### Spots M01 y M07

La proteína secretada rica en cisteína 3 (cysteine-rich secretory protein 3, CRISP-3) fue identificada en estos dos spots. Se detectaron 2 péptidos diferentes que corresponden a esta proteína (Figura 6.24). Esta proteína tiene un peso molecular de 27 kDa y un punto isoeléctrico de 7'43 (Tabla 6.14). De acuerdo con los datos derivados del análisis de imágenes de los geles 2D-DIGE, estos spots se encontraban en cantidades mayores en la muestra del semental F que O y este a su vez en cantidad mayor que en la muestra A ( $p < 0.05$ , Figura 6.25).

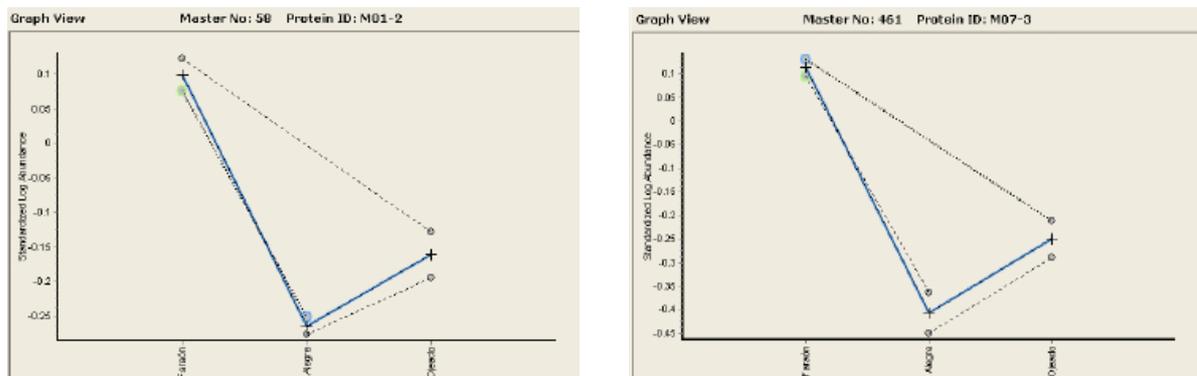
**Figura 6.24.** Secuencia de aminoácidos de la proteína cysteine-rich secretory protein 3 precursor (CRISP-3) (número de acceso NCBI: NP\_001075343.1). Los péptidos presentan una cobertura de 12'24%

```

1  MALLPVLLFLAAVLLPFFPASGQDPGFAALSITKSEVQKEVKNKHNDLRRTVSFLASNMIKMQWDSKTATNAQNW
61  ANKCLLQHSKAEDRAVGTMKCGENLRWSSIPNSWSDAIQNMWHTDEVHDFKYGVGPKIPNAVVGHITQVWVYI
121 SSYRVGGGIAYCPKQGTLKYYVCQYCPAGNYVKNKINTPYEQGTPCARCPGNCDNGLCTNSCEYEDLVSNQ
181  DSLKKIAGCEHELLKENCKATCQCENKIY

```

**Figura 6.25.** Análisis de los geles 2D-DIGE y abundancia diferencial de los spots M01 y M07 para las muestras de los sementales F, A y O



### Spot M02

El receptor de inmunoglobulina polimérica (polymeric immunoglobulin receptor, plgR) fue identificada en este spot. Se detectaron 3 péptidos diferentes que corresponden a esta proteína. Esta proteína tiene un peso molecular de 83 kDa y un punto isoeléctrico (pI) de 5'68 (Tabla 6.14 y Figura 6.26). De acuerdo con los datos derivados del análisis de imágenes de los geles 2D-DIGE, este spot se encontraba en cantidades mayores en la muestra del semental A que F y O ( $p < 0.05$ , Figura 6.27).

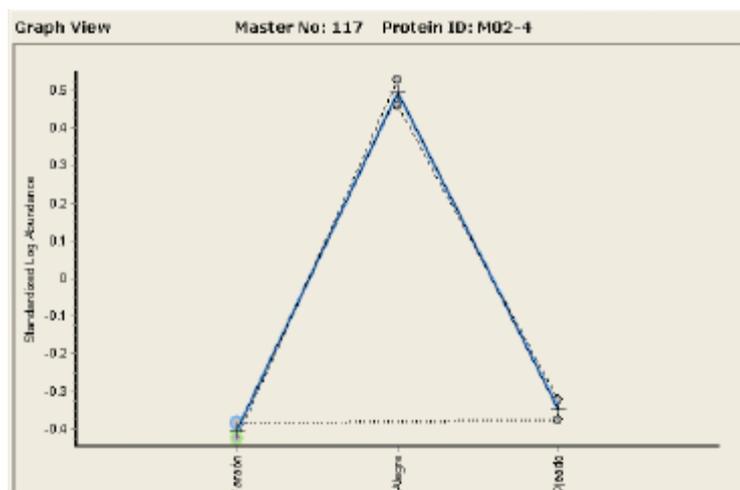
**Figura 6.26.** Secuencia de aminoácidos de la proteína polymeric immunoglobulin receptor (acceso NCBI: XP\_001492348.2). Los péptidos presentan una cobertura de 7%

```

1  MMFFFLTCLLAVFPVVSMIKSPIFGPPPEIDSVEGTSIKCYPPPTSVNRHS RKYWCRQGPKGQCTLISSNGYVSKD
61  YEGRANLITNFPESGTFVVDHLVQGDSSGSYKCGVGINNRGLSFDVRLRVVPGSGVNLNGTQVYAEDLGQKVSI
121 SCPFTSANLPNVKSVCKQIADKHCIRVDSAGYKGPNYEGRAKUIQGTTQTEFFPVIDQLQVEDDGKYVCGAAGD
181  DSSGDKSNVDLHVLPPEPELVYADLGSSVRFDCALGPEVNVVAKFLCQENKEKTCLNLVANTLGQWVNGAFKGR
241  LSGNNGVFSVDVTNLRKEDAGLYLCGANSDGGPRKQSRPIQAWQLPVNEETFP5RPSVVKGWVGGSVAVL
301  CPYNPKEVNSVKSWCRWVEDIQNSGCCPLVQSTGLVKNQYEQYNGRLVLYDEPGNGTYTILNQLTAQDAGFY
361  WCLTNGDIHWRSIMVELKIVEGQPNLKVPKTVNVELGETVQLTCHSPCKFYSYKKFWCKWTDQGC5ALPSQDEG
421  SGQAVVNCDAQNSQUNLTKQVTKGDEGWYWCQVKEGLQYRETVAVVAVKEKGTGSGALSSVRAAAAED
481  EIETSVRKVESVVDPRLSVDTQEKDPEDAAGSIASADPGSSAGQGGSSKVVVSTLVPLALVLALGVLDVGV
541  LBARHRKNVDRISRSYRTDISMSDFENSDFGANDNMGASPV5QETLGGKDEFIATENTVETEPEPKKAKRSSKEE
601  ADMAYTAFLLQANNMAANIQDGP5KA

```

**Figura 6.27.** Análisis de los geles 2D-DIGE y abundancia diferencial del spots M02 para las muestras de los sementales F, A y O



### Spot M03

En este spot se identificó el precursor de la albúmina sérica (serum albumin precursor, 68 kDa, pI 5'95) con un solo péptido (Tabla 6.14 y Figura 6.28). Presentó un nivel de expresión significativamente mayor en el plasma seminal de A que en F y este a su vez mayor que O ( $p < 0'05$ , Figura 6.29).

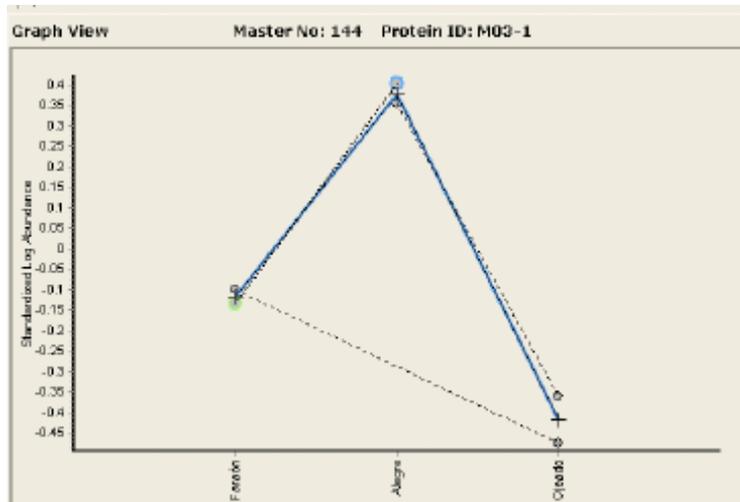
**Figura 6.28.** Secuencia de aminoácidos de la proteína serum albumin precursor (acceso NCBI: NP\_001075972.1). Los péptidos presentan una cobertura de 2'6%

```

1  MIKVVTFVSLLEFLFSAYS RGVLRDRDTHKSEIAHRFNDLGEKHFKGLVIVAFS QYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKK
61  CAADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRATY GELADCCCEKQEPERNECFLTHKDDHPNLPKLPKPEPDAQCCAAF
121  QEDPDKFLGKYLVEVARRHPYFYG PELLFHAEEYKADFTECCPADDKLA CUPKLDALKERILLSSAKERLKCSSFQIN
181  FGERAVKAWSVARLSQKFKADFAEVSKMVDLTKVHKECCHGD LLECADDRADIAKYCEHQDSISGKLKACC
241  DKPLLQKSHCIAEVKEDDLPSDLPALAADFAEDKEICKHYKDAKDVFLGTFLYEYSR RHPDYSVSLLRIAKTYEATLE
301  KCCAEADPPACYRTVFDQFTPLVEEPKSLVKKNCDFEEVGEYDFQNALVRYTKKAPQVSTPTLVEIGRTLKGVG
361  SRCCKLPESERLP CSENHLALALNRLCVLHEKTPVSEKITKCCCTDSLAE R RPCPSALELDEGVVPKEFKAETTFHADIC
421  TLPDEKQIKKQSALAEVKKPKATKEQLKTVLGNFSAFVAKCCGREDKEACFAEEGPKLVASSQLALA

```

**Figura 6.29.** Análisis de los geles 2D-DIGE y abundancia diferencial del spots M03 para las muestras de los sementales F, A y O



#### Spots M05, M06, M 21 y M23

Calicreina (kallikrein-1E2 precursor, 29 kDa, pI 5'40) fue la proteína detectada en todos estos spots. Presentan un total de cinco péptidos (Tabla 6.14 y Figura 6.30). Presentó un nivel de expresión significativamente mayor en el plasma seminal de A que en F y este a su vez mayor que O ( $p < 0.05$ , Figura 6.31).

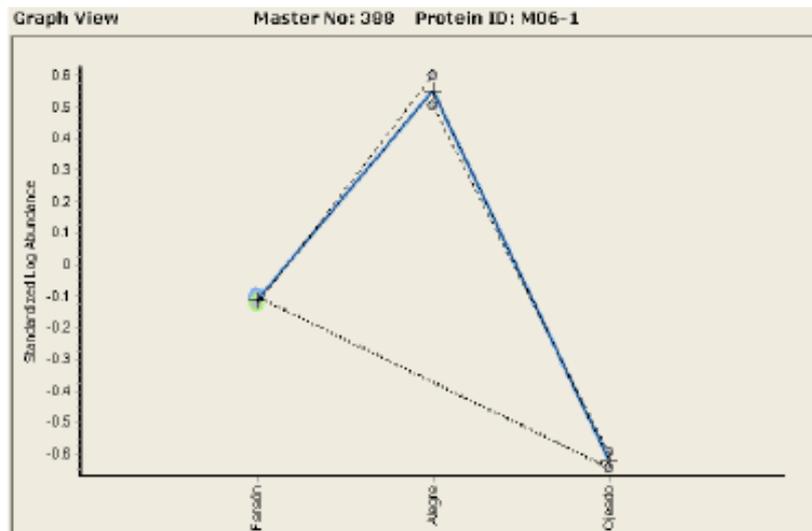
**Figura 6.30.** Secuencia de aminoácidos de la proteína kallikrein-1E2 precursor (acceso NCBI: NP\_001075362.1). Los péptidos tienen una cobertura de 32'95%

```

1 MWFLVLCGLDLSLGETGALPPIQSRRIIGWVECEKHSKFWQVAVYHGGHFQCGGVLVHPQWVLTAAHCMSDD
61 YQMWLGRHNLSEDEDTAQFHQVSDSFLDPQFDLSLLKKYLRPYDDISHDLMLLRLAQPARITDAVKILDLPTEPKLG
121 STCYTSGWGUSTFTNRGSGTLQCVELRLQSNKCARAYPEKMTPEVLCATHRDSDSGICLGDSGGALICDGVFQ
181 GITSWGYSECADFNDNFVFTKVMVPHLKWIKETIEKNS

```

**Figura 6.31.** Análisis de los geles 2D-DIGE y abundancia diferencial del spots M06 para las muestras de los sementales F, A y O



#### **Spots M09, M12, M13, M14 y M16**

En estos cinco spots se detectó la presencia de la proteína de plasma seminal de caballo 1 (Seminal plasma protein (HSP-1), con un total de ocho péptidos diferentes (marcados en verde) (Tabla 6.14 y Figura 6.32). Presentó un nivel de expresión diferente en los diversos spots, como puede visualizarse en la Figura 6.33.

**Figura 6.32.** Secuencia de aminoácidos de la Seminal plasma protein (HSP-1) correspondientes a los spots 09, 12, 13, 14 y 16 respectivamente

**1** NPDQQLMITKHSATVTPENKCVFPFNRYGYRYDCTR**DSTIWCSLTGTSGSWK**YCAATDYAK**CAPFPVTR**G  
**61** QTYDRCTTDGSLFRISWCSVTPNYDHHGAWK

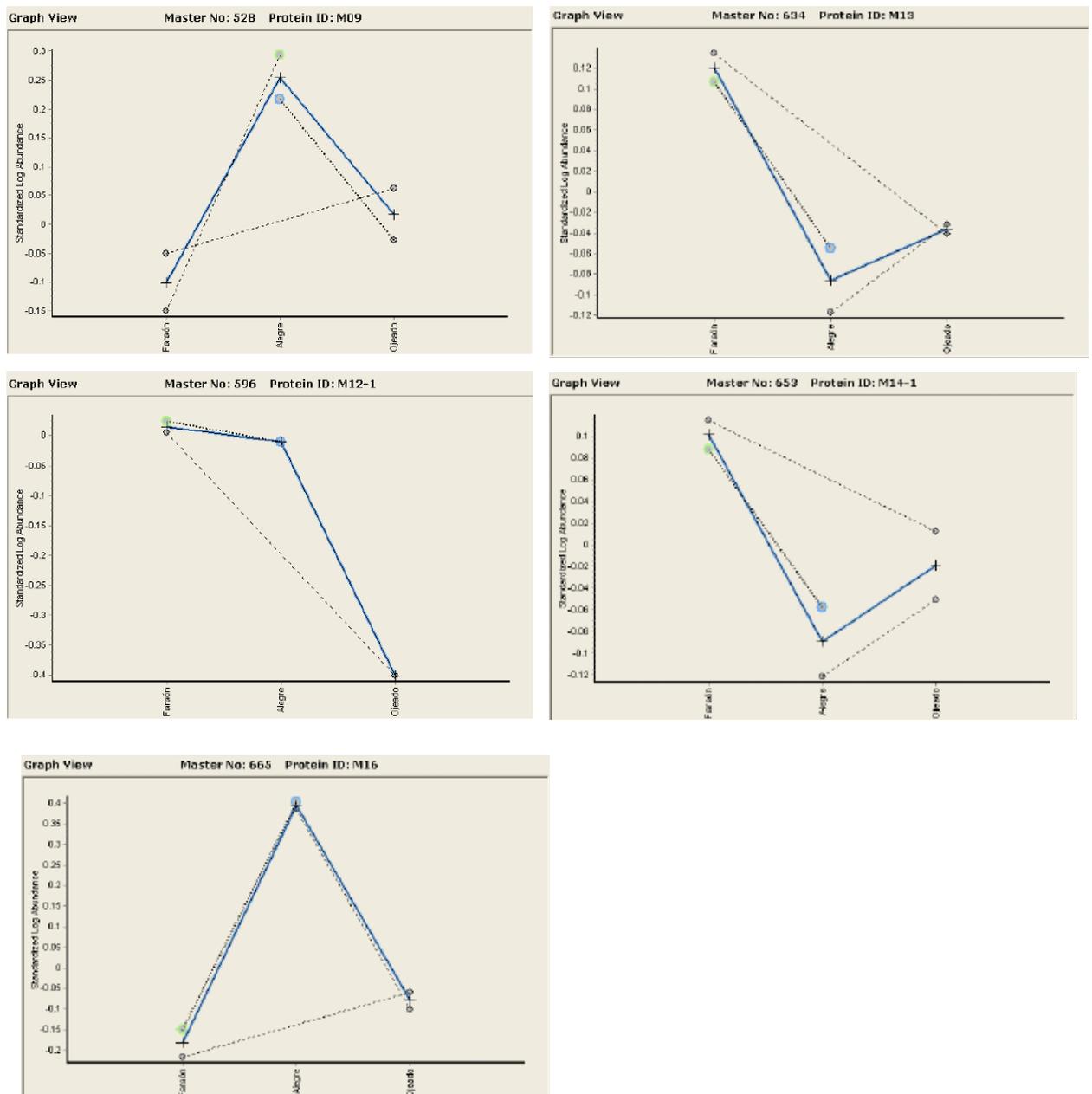
**1** MAPCLGIFULVGAICIFLQLDHVDGDKQPIITLTSATMKPDYK**CAPFPNTR**GKMYFDCTRADSFYRWCSLNEDYSG  
**61** GKWKYCAEDYAK**CVFPFVTR**GQTYNRCTTDGSLFWISWCSVTISYDRDGAWRYCYNTILNCCVHLTHGHEC  
**121** NEAFEICMKKIKKSQA

**1** MAPCLGIFULVGAICIFLQLDHVDGDQQPIATDHSPTKPDNK**CVFPFIYQGR**QHYDCTRADSFYRWCSLTKYS  
**61** GKWKYCAEDYAKCFFPFVYRGR**TYHTCTTDGSVLLIPWCSVTPDYDLHGAWK**YCIQPVYLTHGHECDQAFETQ  
**121** VKKIKKSQA

**1** MAPCLGIFULVGAICIFLQLDHVDGDQQPIATDHSPTKPDNK**CVFPFIYQGR**QHYDCTRADSFYRW**CSLTK**YS  
**61** GKWKYCAEDYAKCFFPFVYRGR**TYHTCTTDGSVLLIPWCSVTPDYDLHGAWK**YCIQPVYLTHGHECDQAFETQ  
**121** VKKIKKSQA

**1** MAPCLGIFULVGAICIFLQLDHVDGDQQPIATDHSPTKPDNK**CVFPFIYQGR**QHYDCTRADSFYRW**CSLTK**YS  
**61** GKWKYCAEDYAKCFFPFVYRGR**TYHTCTTDGSVLLIPWCSVTPDYDLHGAWK**YCIQPVYLTHGHECDQAFET  
**121** QVKKIKKSQA

**Figura 6.33.** Análisis de los geles 2D-DIGE y abundancia diferencial de los spots M09, M12, M13, M14 y M16 para las muestras de los sementales F, A y O



### Spot M18

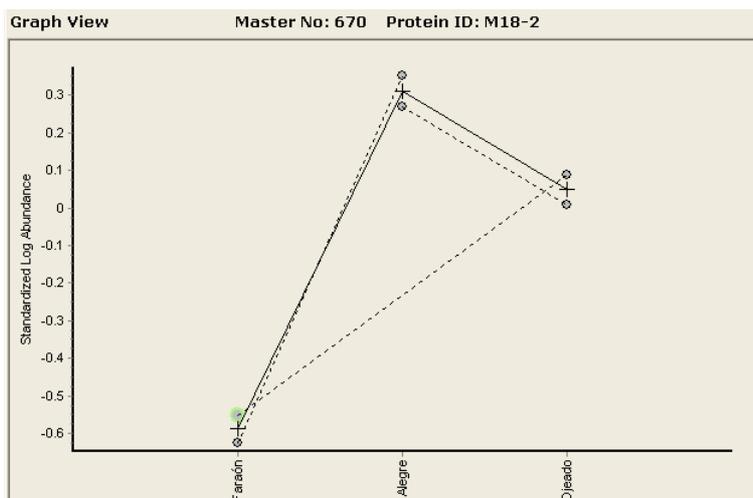
La proteína identificada en este spot corresponde a la proteína matriz de la remodelación asociada a proteína 5 (matrix-remodeling-associated protein 5). Tiene un peso molecular de 31 kDa y un pI de 8'62 y ha sido detectada con un sólo péptido (Tabla 6.14 y Figura 6.34). Se observó un nivel de expresión significativamente mayor en el plasma seminal de A que en O y este a su vez mayor que F ( $p < 0'05$ , Figura 6.35).

**Figura 6.34.** Secuencia de aminoácidos de la proteína PREDICTED: matrix-remodeling-associated protein 5 (acceso NCBI: XP\_001500278.1). Los péptidos tienen una cobertura de 0'88%

```

1  MPTRS HWRELVSVVLVWGHPPAALACPHPCACYPVSEVHCFRSLASVPAGISKHVERINLGFNSIQALSKTSFAGLTKLELLMIHGNNIPSPIDGALRDLSSLQVFKPSYKLRVITGQLQLGWS
61  LMLRLHIDHNKIERHPQAFNGLSLRLHLLEGNLLHQLHPGTFSTFFLDYFRLSTIRHLYLAENMIRLPTGMLQNMPLLENLYLHGHPWSQCDQDMRWFLWDAKSKGLKCKKDKAYEGGLCA
121  MCSSPKKMYKQEIHKIKDITCQKPSIESPLRQNRSELEEQQDEEDSDSGLSLEGFQPPWNISLNMIDEHQNTVNLVCDIRKPMQVYKHLNGTDPQEIENATVALDFECPMTRENYEKDWKUAY
181  YSEVPVKLHRELITGDPKVSQYRQDADDALYTGVRRAHILAEPBWMQPSIDIQLNRRQSTAKKVFVLSYSSHYSLTMAAKDARQSRSR5WMMIEPSGAVQRAQTVLEGSPCQLSCHKVKA5
241  E5PSIPWVLPDGSVLKAPMEDQDSKFSILTSGWUKIKSTDQLDSGLYQCIAQVQRDEMDQMMVYRVLVQPPATQPPDSHTVTIQKNPGE5WMLPCTALAIPEARLSWILPNKRINDLANISDAYMIL
301  ANGLSIPKVVQVSDSHYRQVAVNQQGVDFHFGVTVSKKSGR5SKRGRPPGGKABSRGRGDVVEDEGSGMGEEDNSTRVLPKDKQEMVYKTKDDAATGQKKTKKGRBKLDKWK
361  SEKEPETNIAEGRRVFE5RRRINM5ASKQINPEHWADILARV8RQKNLPKGT5EVPRQVKITTP5PV5PEETPLLPVLP5PSIWPVQIT5AE55ADMSLLGEEELV55T55TEM5LEH5GHD5VLT5EPK5T5
421  MHLEELTD5FE5KTD5TF5TDIG5NM5ATATL5I5AP555PT5QLD5TV5EPTN5I5ATE5GW5TP5DV5GAM5E5T5NE55PLD5ATS5LA5E5TV5V5Y5PW5ETN5R5PN5ED5K5MIN5EL5T5H5TP5T5M5VA
481  DSK5E5PF5ED5L5LEE5GV5PT5V5PL5QE5TD5NS5QLVK5G5L5GT5Q5NS5LIK5K5TE5EN5F5Q5W5EG5DM5LER5D5PTN5R5P5E5SK5R5Q5G5IE5FT5LRD5ST5P5G5VD5K5AL5FK5HP5G5ET5L5G5L5FD5K5D5T5V5AV5MM5PT5Q5K5P5T5
541  P5V5LT5HP5SR5KR5Q5K5GR5K5R5HP5NR5FR5HR5KH5QL5PT5TP5AP5TE5FL5TR5PT5Q5V5EV5K5IP5Y5Q5V5E5LL5V5T5W5VD5TV5G5TP5K5Q5V5EM5G5K5DA5EP5VK5G5P5R5K5H5G5K5R5PK5H5R5S5T5V5R5Q5P5S5V5S5N5P5P5E5Q5HN
601  N5V5N5P5SD5T5V5L5L5T5M5AS5LR5TG5AP5RE5TR5K5E5D5Y5I5T5K5V5H5L5H5DK5L5Q5ET5IP5V5TY5K5P5V5L5G5E5N5E5K5ND5G5V5T5N5IND5HT5D5L5VP5G5K5V5TD5AV5P5S5G5FK5V5TV5G5EF5Q5GE5P5S5R5P5GT5P5W5N5PP5K5AA5Q5PR5GL5Q
661  TDT5P5V5S5W5E5TF5D5TP5FF5E5ED5PD5FP5E5F5P5S5VA5V5TL5Q5VA5TL5S5M5K5A5E5S5SR5K5A5E5TI5G5Q5D5H5Q5E5T5P5AE5I5G5P5Q5NI5TP5AP5R5K5E5AS5V5P5PT5L5V5LA5E5TT5K5P5M5PL5S5R5T5P5T5G5S5KE5I5FL5NY5VG5E
721  TKTP5V5N5NE5GT5Q5HM5R5P5H5EL5T5SS5N5Q5D5Q5FN5LP5K5Q5ELE5K5E5FD5R5TK5DL5R5P5Q5P5D5S5Q5H5Q5D5GR5V5Q5V5R5Q5PAR5V5PA5K5IP5R5G5TV5R5P5Y5V5AT5Q5AS5GY5IV5T5Q5P5R5H5FN5K5PE5I5AY5R5V5L5K5N5KH
781  FT5P5TL5S5T5TP5V5V5PW5H5PK5P5G5IP5SK5L5D5Q5G5TD5RF5N5G5N5K5V5V5G5N5N5I5LD5R5D5S5V5G5K5P5S5R5V5P5HY5P5H5R5P5FF5N5K5L5S5FP5Q5FG5V5L5K5P5Q5IPT5P5AP5V5M5R5K5V5N5P5AP5Y5N5R5H5S5Q5I5H5V5DF5PP5AP5L
841  LHP5R5T5AP5S5M5NL5Q5NIP5LV5Y5TR5S5I5P5IV5S5G5Q5P5RS5FH5Q5S5K5L5S5PV5G5P5ASK5P5WL5G5E5K5P5Q5IIT5K5FP5Q5V5S5I5A5E5D5AM5IP5C5E5AT5K5P5K5P5IT5W5K5V5T5G5AIM5TP5H5TR5V5Q5R5F5E5L5KN5GT5F5IR5K5V5Q5V
901  Q5DR5Q5Y5M5CT5AK5NL5H5Q5VD5R5M5V5L5S5V5T5V5Q5QP5Q5IL5ASH5Y5Q5D5V5TV5L5G5D5TI5AME5CLA5K5TP5AP5Q5IS5W5IF5D5GR5V5Q5V5P5VE5GR5V5TL5H5EN5R5L5S5I5K5E5AS5P5DR5GV5Y5K5CV5AS5NP5AG5AD5SL5AIR5L5H
961  V5A5AL5P5V5H5Q5E5K5EN5IS5L5PP5G5L5I5H5H5CT5AK5A5AP5L5S5V5R5W5L5RD5GT5Q5IR5P5Q5F5I5N5G5N5L5V5FP5N5G5T5Y5L5R5N5L5AP5K5D5S5GR5YE5C5VA5AN5LV5GS5AR5TV5QL5TV5Q5RA5A5AN5R5IT5G5T5P5Q5RT5D5V5RY5G5TL5RL5D
1021  CS5AS5GD5PW5FR5I5D5W5RL5PK5R5M5ID5AL5FS5D5TR5IK5V5F5ANG5TL5V5K5S5V5TD5K5D5AG5D5Y5L5C5V5AR5N5K5V5GD5D5P5V5L5K5V5N5V5M5K5P5AK5IE5H5E5ND5HR5V5FY5G5D5L5K5VD5CV5AT5GL5PY5E5IS5W5SL5D5G5SL5V5NS5FM5Q
1081  S5D5S5G5R5TK5RY5V5FN5G5TY5F5NE5V5GM5RE5E5G5D5Y5C5FA5EN5Q5V5G5K5D5EM5R5V5R5V5M5TE5P5A5R5N5K5T5S5M5V5Q5V5PY5G5D5V5TV5A5C5E5AK5E5PT5R5V5TW5L5PT5N5R5L5I5T5S5D5K5Y5Q5I5Y5Q5D5G5TL5I5Q5KA5Q5R5D
1141  S5G5NY5C5V5V5R5NS5AG5ED5R5K5M5W5H5V5N5V5Q5SP5K5IN5G5NP5D5A5IT5V5R5E5I5A5AG5S5R5K5L5D5C5Q5AE5G5I5P5R5V5L5W5AF5E5G5V5L5P5AP5Y5Y5G5N5R5I5H5R5N5G5L5D5I5R5L5K5D5S5V5Q5L5AC5I5GR5NE5G5E5AR5I5V5Q5L5TV5L5E
1201  P5VE5K5PI5FD5P5V5E5KIT5AM5AG5HT5IS5LN5CS5AA5G5T5PT5L5L5W5L5P5N5G5TEL5Q5S5G5Q5L5Q5R5FY5H5GD5G5ML5HS5GL5S5ID5AG5AY5R5CV5AR5NS5AG5Y5ER5L5V5L5K5V5GL5K5P5EM5K5Q5Y5HN5L5V5I5N5G5E5L5Q5L5Q5L5PP
1261  G5G5R5EA5H5F5W5L5P5N5G5M5V5L5G5P5Q5A5Q5GR5SL5G5EN5G5I5V5R5D5AS5V5FD5R5G5T5V5C5K5AD5E5Y5G5P5S5V5N5F5V5I5M5AY5P5R5I5T5E5P5T5V5I5Y5TR5G5N5TV5K5M5N5C5M5AM5G5I5P5K5A5E5I5W5EL5P5DK5SH5L5TA5G5A5Q5AL5Y5G
1321  NR5FL5P5Q5G5SL5TI5Q5Q5AT5Q5R5DA5G5FY5K5CT5AK5N5IL5GR5DS5K5TY5IH5V5Y
    
```

**Figura 6.35.** Análisis de los geles 2D-DIGE y abundancia diferencial del spot 18 para las muestras de los sementales F, A y O



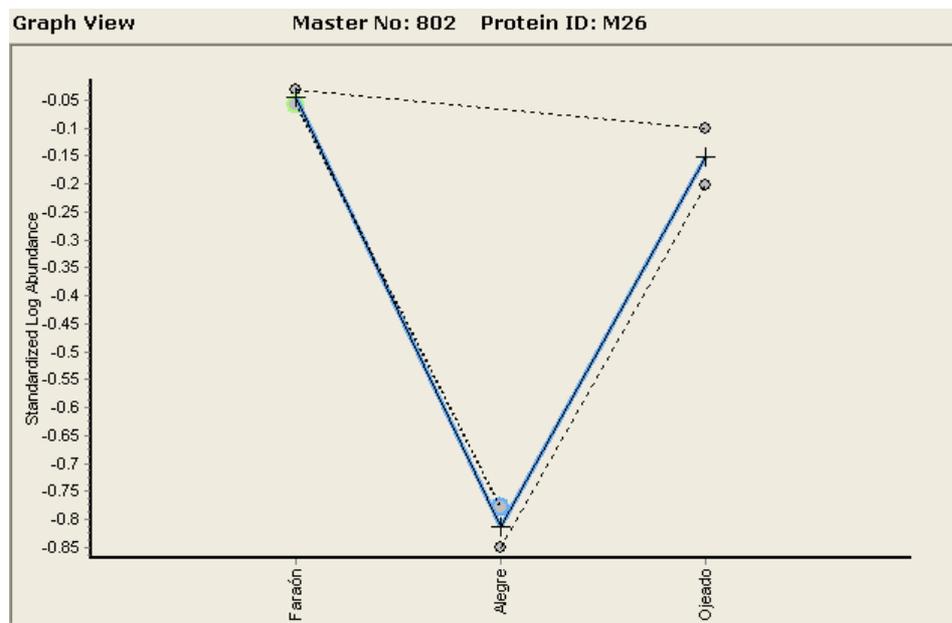
**Spot M26**

La proteína de plasma seminal de caballo 3 (seminal plasma protein A3-like, HSP3, 13 kDa, pI 6) ha sido localizada en este spot y se han detectado un total de tres péptidos (Tabla 6.14 y Figura 6.36). Esta proteína HSP3 pertenece a la misma familia que la CRISP-3 anteriormente citada. Presenta un mayor nivel de expresión en el plasma de F y O que en las muestras de A ( $p < 0.05$ , Figura 6.37).

**Figura 6.36.** Secuencia de aminoácidos de la proteína PREDICTED: seminal plasma protein A3-like (acceso NCBI: XP\_003362317.1). Los péptidos tienen una cobertura de 38'26%

1 MALHLGIFLMWAGARVFLQLD HVDGDNQCVFPDYS GKRF**FDCTK**DGSLYSWCSLTSYSGRWRYCTDIDFAK C  
 61 VFPFIYNGQKFK**CTTAGSLLWN<sup>Y</sup>WCSVTADYDR**DGAWRYC

**Figura 6.37.** Análisis de los geles 2D-DIGE y abundancia diferencial del spot M26 para las muestras de los sementales F, A y O



**Spot M29**

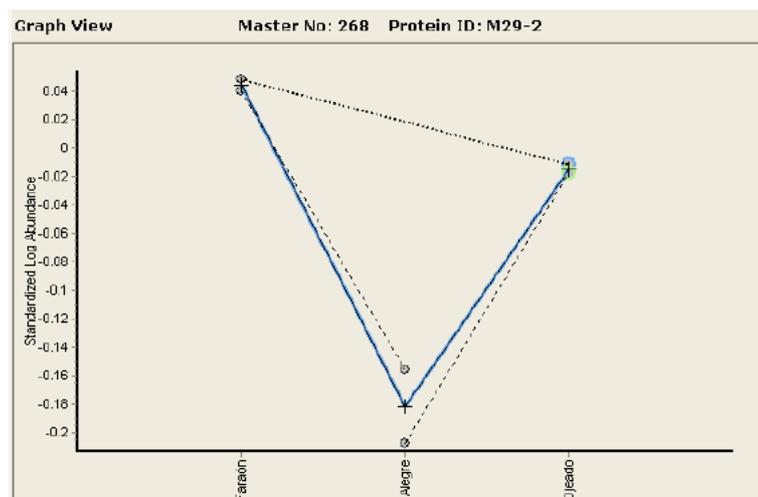
La proteína detectada en este spot corresponde a la trombospodina tipo 1 (Thrombospondin type-1 domain-containing protein 7B; 17 kDa, pI 8'01). Presenta un solo péptido (Tabla 6.14 y Figura 6.38). Presenta un mayor nivel de expresión en el plasma de F y O que en las muestras de A ( $p < 0,05$ , Figura 6.39).

**Figura 6.38.** Secuencia de aminoácidos de la Thrombospondin type-1 domain-containing protein 7B (acceso NCBI: NP\_766073.2) Los péptidos tienen una cobertura de 1'87%

```

1  MFLRSDLAVTHWVSRMRKLFVLVLSLLSQAHLERGRKDNQFDWKTGPWGRCAAGDCGPGGAQSRVAVWFHIEGWTSFMSNCDSSQPPKERSQFRVCDWHSDFQWVSVSWHRCLLV
61  PGAQGEPRPRAVECVTAQHGLQHRTRVRCLOKLNRTMWSNEICEHFAPQPPTTEACLIPCPRDQVVSFSPWSTCFEGCGKKLQHRTRVALAPPLYGLQCPNLTESRACEAPVSCPLGKEE
121 YSFLKVGPMWSKCRPLHLKEVDLSGRNIQDFSSDSNEQVTLTHQS YKAHHHSQPQDVVVGFGTRQVWCTRSDGRNALLS LCVRDSFPLTVQPCVMPKDCSESEWSPWSPCKTORSGLSPG
181 VRSRSRNVKHLAIQGGQECPELLEKETCIAEGFLQPCPRYSWRSEWKECQVSLLEQHDPLWHTGPICGGGIQIREVYCAQSLPATIASRTKEVSRPVERTLC LQPAFASQQLCNVPCSMID
241 CIVSSWSTWGPVCFENCHDPQGGKGRFRMRQRHVUMESTGPMGRCPHLAESVPCEDPIMCHRWLASEGICADHGKCGLGHRIKAVCQNERGEEVSGGLCPVPPPERMAACEIPCRM
301 DCVVS EWTWSSCSQSNKNSDQKQTRSR SILALAGEGKTCPSQELQ EYRLONDHSCTQLYWEISAWGSCSENTLVLTALNVTIGWNGEATCGVGIQTRKVFQIKSHVGVQVWTKRCPES
361 TRPETVRPCLFLPCKKDCLVTAPEWTPCPRPCQPPGNTTIKQSRYRIHQEAAAGGQEQCDTLFEERECEDISLCPSYRWKPKQKWSSCILVPESIRQGRGTSEACGKGLQTRAVSCISDDNQS AE
421 MTECLKQMNGMPPPLVQECTIPCRRDCTFTPWSKFPCSKNCEATQIRRRQLTGSRKKEKQCDASLYLVEMEPCCDITFMSHPYGNWSAACILPEGRDAQGGGLWVQGGDKKCEGEGV
481 BFRALACSNNINGRPVDFPCNSGYIQEACVIPCFFDCKLSDWSSWGSQSSCGIGVRIKWKLEKPYSGRCPKLDLKNQVHEAVPCYSECDQYSWVVEHWSPCKINNELSRPCGRGT
541 QSRIRICVSTADREGAVNRS LCHQDDAPQETGACSLCPSECVMS EWGWSRCPQSCDPHAMQBRTRHLLRPSLNSBTCGEDSQVVRPCLLNENCFQFYNLTEWSTCQLSENVS CGQ
601 GVRTRLLSCVRS DGKSVSMIDHCEQRNLEKPRQRM SIPCLVECVVNCQLSGWTTWTECSQTCGCGGRMSRTRFIIMPTQGEGRQCPTELTQKPCPVTPCYSWVVLGNWSAACKLEGGDCG
661 EGVQVRSFV VVHNQGISHTAVPVEEALQEVFPQEGILKQLCSVPCPGDCHIIPWSEWSKCELTICDGRSFETGRQSRSTFIQSFENQDSQFQVLETRPCTGGKCYHYWKA SLWNNN
721 ERTVWCGRSDGLNVTGCGSPQARPAAIRQCIPACKKPSYCTGGVCGCEKGYTEIMRBSQFLDYCMKVPQSEDKKADVKNLGKNRPVNSKIHDFKQWSLQPLDPDGRVKIMWVYGV
781 SGGFLIMFLVPSYLVCKKPKPHQSTPRHQKPLTLAYDGDLDIM
    
```

**Figura 6.39.** Análisis de los geles 2D-DIGE y abundancia diferencial del spot M29 para las muestras de los sementales F, A y O



### Spot M30 y M31

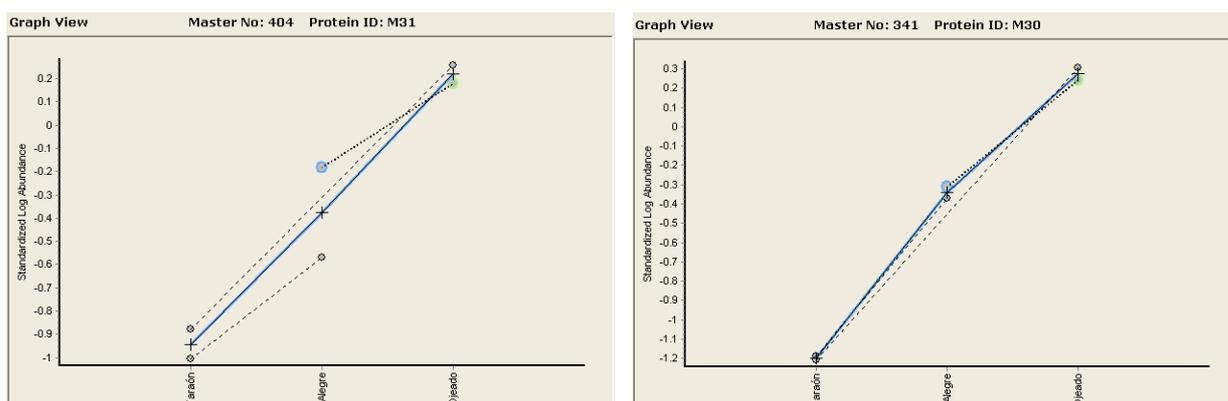
Una sola proteína, la calicreina (kallikrein-1E2 precursor, 29 kDa, pI = 5'40), fue identificada en estos dos spots a través de un total de dos péptidos (Tabla 6.14 y Figura 6.40), como previamente se había identificado en los spots 05, 06, 21 y 23. En este caso y a diferencia de lo mostrado en los puntos antes mencionados, se presenta un mayor nivel de expresión en el macho O, que en A y este a su vez mayor que F (p < 0'05, Figura 6.41).

**Figura 6.40.** Secuencia de aminoácidos de la kallikrein-1E2 precursor (acceso NCBI: NP\_001075362.1). Los péptidos tienen una cobertura de 11'11%

```

1 MWFLVLCGLDLSLGETGALPPIQSRIIGWVECEKHSKPWQVAVYHQGHFQCGGVLVHPQWVLTAAHCMSDD
61 YQMWLGRHNLSEDEDTAQFHQVSDSFLDPQFDLSLLKKYLRPYDDISHDLMLLRLAQPARITDAVKILDLPTEPKL
121 GSTCYTSGWGLSTFTNRGSGLQCVELRLQSNKCARAYPEKMTFVLCATHRDDSGSICLGDSGGALICDGVF
181 QGITSWGYSECADFNDNFVFKVMPHLKWIKETIEKNS
  
```

**Figura 6.41.** Análisis de los geles 2D-SIGE y abundancia diferencial de los spots M30 y M31 para las muestras de los sementales F, A y O



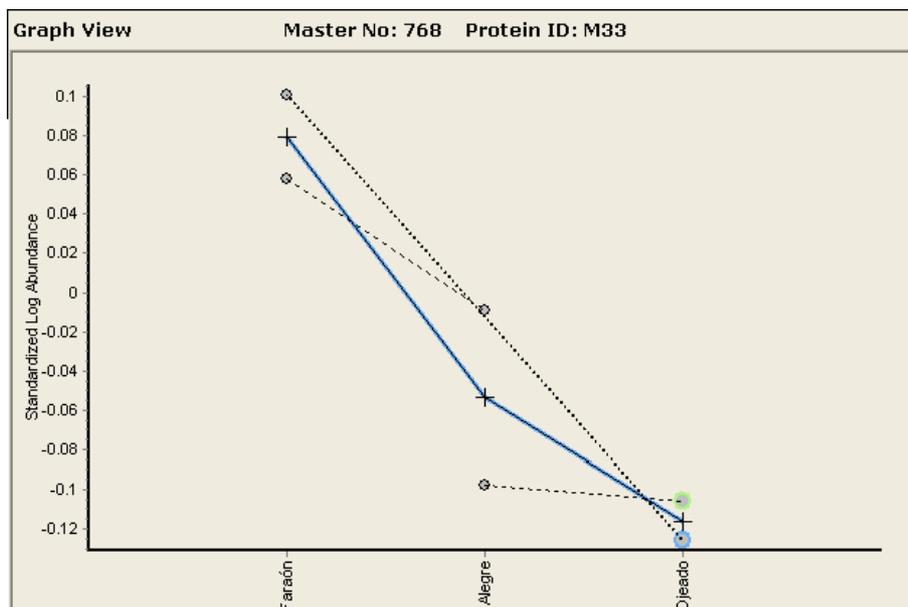
**Spot M33**

Igual que en el spot M26, la proteína localizada en este spot corresponde a la proteína de plasma seminal de caballo 3 (13 kDa, pI 6). Se identificó un solo péptido (Tabla 6.14 y Figura 6.42). En este caso la expresión en la muestra F fue superior a la de la muestra A y a su vez esta mayor que O ( $p < 0.05$ , Figura 6.43).

**Figura 6.42.** Secuencia de aminoácidos de la seminal plasma protein A3-like (acceso NCBI: XP\_003362317.1). Los péptidos tienen una cobertura de 14.78%

1 MALHLGIFLWAGAPVFLQLDHVDGDNQCVFPFDYSGKRYFDCTK **DGSLYSWCSLITSYSGR**WRVYCTDTEFAK C  
 61 VFFPIYNGQKPKCTTAGSLLWNYWCSVTADYDRDGAWRYC

**Figura 6.43.** Análisis de los geles 2D-DIGE y abundancia diferencial del spot 33 para las muestras de los sementales F, A y O



**Tabla 6.14.** Resumen, identificación y resultados cuantitativos de las secuencias de las proteínas detectadas en el análisis 2D-DIGE

Spot	Abundancia (2d-DIGE)	Denominación	Mw, pI	Nº acceso NCBI	Peptidos (cobertura %)
01, 07	F>O>A	Cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3)	27 kDa, pI 7.43	NP_001075343.1	2 (12.24%)
02	A>F, A>O, F=O	Polymeric immunoglobulin receptor (pIgR)	83kDa, pI 5.68	XP_001492348.2	3 (7%)
03	A>F>O	Serum albumin precursor	68 kDa, pI 5.95	NP_001075972.1	1 (2.6%)
05, 06, 21, 23	A>F>O	Kallikrein-1E2 precursor	29 kDa, pI 5.40	NP_001075362.1	5 (32'95%)
09	A<F, A<O, F=O	Seminal plasma protein HSP-1	13 kDa, pI 8.14	CAA07074.1	8 (25'71%)
12	NS	Seminal plasma protein HSP-1	19 kDa, pI 7.91	XP_001501767.2	8 (9'7%)
13	A<F, O<F, A=O	Seminal plasma protein HSP-1	18 kDa, pI 7.51	XP_001499814.1	8 (25.32%)
14	F>O>A	Seminal plasma protein HSP-1	18 kDa, pI 7.51	XP_001499814.1	8 (29.75%)
16	A>F, A>O, F=O	Seminal plasma protein HSP-1	18 kDa, pI 7.51	XP_001499814.1	8 (10.71%)
18	A>O>F	Matrix-remodeling-associated protein 5	31 kDa, pI 8.62	XP_001500278.1	1 (0.88%)
26	A<F, A<O, F=O	Seminal plasma protein A3-like	13 kDa, pI 6	XP_003362317.1	3 (38'26%)
29	A<F, A<O, F=O	Thrombospondin type-1 domain-containing protein 7B	17 kDa, pI 8.01	NP_766073.2	1 (1.87%)

Spot	Abundancia (2d-DIGE)	Denominación	Mw, pI	Nº acceso NCBI	Peptidos (cobertura %)
30, 31	O>A>F	Kallikrein-1 E2 precursor	29 kDa, pI 5.40	NP_001075362.1	2 (11.11%)
33	F>A>O	Seminal plasma protein A3-like	13 kDa, pI 6	XP_003362317.1	1 (14.78%)

#### **6.3.6. Identificación de proteínas en la totalidad del plasma seminal**

Para confirmar los resultados anteriormente, se hizo una digestión en bruto con tripsina de las muestras (aprox. 10 µg de cada muestra, en medio soluble) y se procedió a la identificación de las proteínas presentes en las muestras de cada animal que se muestran en las tablas 6.15, 6.16 y 6.17.

Finalmente comparamos la presencia de las cuatro proteínas más importantes presentes en el plasma seminal de los tres animales tabla 6.18.

**Tabla 6.15.** Resumen, identificación y resultados cuantitativos de las proteínas detectadas en la muestra de plasma seminal del semental A

Group	Spectra	Peptides	Score	Cover %	Intensity	Protein MW	pI	Species	Database	Protein Name
1	17	5	82.30	18	1.85e+007	29392.6	5.40	Equus caballus	126352580	kallikrein-1E2 precursor
2	11	4	43.53	32	7.27e+005	16644.8	7.54	Equus caballus	126352684	binder of sperm 1 precursor
3	3	2	19.59	24	1.22e+007	18245.0	7.51	Equus caballus	149722364	seminal plasma protein HSP-1-like
4	2	2	16.09	8	6.08e+005	64838.3	10.24	Equus caballus	338712892	proline-rich protein 14
5	2	2	16.09	2	1.77e+006	294111.1	9.03	Equus caballus	338717800	myosin-IXa

**Tabla 6.16.** Resumen, identificación y resultados cuantitativos de las proteínas detectadas en la muestra de plasma seminal del semental F

Group	Spectra	Peptides	Score	Cover %	Intensity	Protein MW	pI	Species	Database	Protein Name
1	16	5	74.82	18	1.14e+007	29392.6	5.40	Equus caballus	126352580	kallikrein-1E2 precursor
2	12	5	46.12	33	3.65e+006	16644.8	7.54	Equus caballus	126352684	binder of sperm 1 precursor
3	8	4	42.58	37	1.28e+006	27278.3	7.43	Equus caballus	126352542	cysteine-rich secretory protein 3 precursor
4	4	4	38.60	27	1.28e+006	19143.0	7.91	Equus caballus	194215547	seminal plasma protein HSP-1-like
5	3	2	30.19	20	4.46e+006	18245.0	7.51	Equus caballus	149722364	seminal plasma protein HSP-1-like
6	2	2	18.53	4	2.38e+006	148726.0	6.58	Equus caballus	338725451	uncharacterized protein KIAA1107-like
7	2	2	17.24	7	3.94e+005	50691.2	5.35	Equus caballus	194225643	sorting nexin-30
8	2	2	16.90	6	3.10e+006	78780.0	8.14	Equus caballus	194210106	GTPase IMAP family member 8
9	2	2	16.45	5	1.86e+006	84348.1	8.83	Equus caballus	338721713	leucine-rich repeat-containing protein 41
10	2	2	16.37	6	3.22e+006	104480.8	9.35	Equus caballus	338723128	protein CBFA2T3-like
11	2	2	16.31	4	3.69e+006	134517.0	5.24	Equus caballus	149721146	lisH domain and HEAT repeat-containing protein KIAA1468-like isoform 1
12	3	2	16.28	4	1.00e+005	129346.7	8.76	Equus caballus	194210819	zinc finger protein 687

**Tabla 6.17.** Resumen, Identificación y resultados cuantitativos de las proteínas detectadas en la muestra de plasma seminal del semental O

Group	Spectra	Peptides	Score	Cover %	Intensity	Protein MW	pI	Species	Database	Protein Name
1	9	5	62.97	18	1.42e+006	29392.6	5.40	Equus caballus	126352580	kallikrein-1E2 precursor
2	9	6	59.90	38	9.52e+005	16644.8	7.54	Equus caballus	126352684	binder of sperm 1 precursor
3	7	4	29.25	2	2.42e+005	432800.2	8.49	Equus caballus	338712528	transformation/transcription domain-associated protein isoform 1
4	6	3	23.72	2	8.37e+005	385963.2	4.99	Equus caballus	338716054	golgin subfamily B member 1
5	5	3	22.36	4	2.72e+005	137029.6	9.04	Equus caballus	338720371	protein KIAA0649-like
6	5	4	21.43	2	5.85e+005	519118.1	5.88	Equus caballus	338728397	pectin-like
7	4	3	20.32	7	5.50e+005	133422.6	4.87	Equus caballus	194220996	myelin transcription factor 1-like protein-like isoform 1
8	3	3	19.82	1	9.08e+005	490531.0	6.20	Equus caballus	194212629	cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1-like
9	5	2	18.15	7	2.14e+007	96701.9	9.53	Equus caballus	338728139	uncharacterized protein DKFZp781G0119-like
10	3	1	17.39	18	3.75e+006	18245.0	7.51	Equus caballus	149722364	seminal plasma protein HSP-1-like
11	2	2	16.93	0	1.47e+006	372870.1	7.54	Equus caballus	338714772	TPR and ankyrin repeat-containing protein 1-like
12	2	2	16.67	6	2.38e+007	95989.4	5.76	Equus caballus	338720903	coiled-coil domain-containing protein 110-like

**Tabla 6.18.** Comparación de las proteínas del plasma seminal detectadas en los tres animales estudiados

	Alegre				Faraon				Ojeado			
	Peptides	Score	Cover	Intensity	Peptides	Score	Cover	Intensity	Peptides	Score	Cover	Intensity
kallikrein-1E2 precursor	5	82.30	18	1.85e+007	5	74.82	18	1.14e+007	5	62.97	18	1.42e+006
binder of sperm 1 precursor	4	43.53	32	7.27e+005	5	46.12	33	3.65e+006	6	59.90	38	9.52e+005
seminal plasma protein HSP-1-like	2	19.59	24	1.22e+007	4	38.60	27	1.28e+006	1	17.39	18	3.75e+006
cysteine-rich secretory protein 3 precursor	1	8.11	7	2.72e+005	4	42.58	37	1.28e+006	1	12.61	7	5.19e+005

## 7. DISCUSIÓN

La posibilidad de obtener y conservar espermatozoides fértiles de animales que tienen un gran valor genético o ecológico después de que estos hayan muerto, se puede considerar como una técnica de gran importancia para el mantenimiento y conservación de razas y especies (Braun et al., 1994; Garde et al., 1994; Kaabi et al., 1999; Blash et al., 2000; Bruemmer, 2006; Ferraz et al., 2011).

La cola de epidídimo es el lugar idóneo para recuperar células espermáticas post-mortem debido a la mayor concentración de estas células con un estado de madurez muy avanzado (Kaabi et al., 1999). Por lo tanto, es importante diseñar métodos para obtener y criopreservar la mayor cantidad posible de espermatozoides de esta región que posteriormente puedan ser aplicados con éxito con las técnicas que se utilizan en reproducción asistida (Godke et al., 2003).

A veces se hace difícil o imposible transferir una tecnología reproductiva directamente de unas especies animales a otras o de un tipo de espermatozoide a otro. Por ello, se necesita de un proceso de experimentación para el tratamiento de los espermatozoides que sea adecuado para las distintas especies animales (Roldán and Garde, 2004). Por otra parte y dado que los protocolos de congelación se han desarrollado específicamente para la conservación de los espermatozoides eyaculados de una especie en concreto, es necesario profundizar en el estudio de los procedimientos que optimicen la congelación de las células epididimarias de caballo que tienen unas características específicas diferentes a las de espermatozoides eyaculados que han estado en contacto con el plasma seminal (Volkman et al., 2001; Weston et al., 2005).

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que se pueden obtener y criopreservar espermatozoides procedentes de epidídimo que fueron conservados a 4°C hasta 96 horas sin perder su capacidad fecundante. Este hecho es de gran interés ya que podría permitir obtener descendencia utilizando técnicas de reproducción asistida tales como IA, FIV o ICSI.

Por otra parte hemos observado que la incubación de los espermatozoides del epidídimo en presencia de plasma seminal supone un cambio en los parámetros espermáticos post-descongelación. Estos cambios son diferentes dependiendo del

animal del cual procede este plasma seminal y está asociado a la diferente composición proteica y lipídica así como a la diferente capacidad antioxidante que posea.

En nuestro trabajo hemos planteado tres objetivos, pero para una mejor discusión y comprensión de nuestros resultados, hemos dividido este capítulo en dos secciones. En la primera sección discutiremos el efecto de la conservación de epidídimos de caballo hasta 96 h a 4°C sobre la calidad espermática antes y después de la criopreservación. En la segunda sección discutiremos los resultados del estudio del efecto de la incubación de los espermatozoides de epidídimo con plasma seminal sobre la calidad de espermatozoides frescos y congelados-descongelados. Finalmente en la última sección analizaremos y discutiremos los resultados en la composición del plasma seminal en cuanto a proteínas, capacidad antioxidante y ácidos grasos, de animales con distinto rendimiento en la criopreservación espermática.

***Experiencia 1. Estudio del efecto del tiempo de conservación del epidídimo en refrigeración a 4°C (0, 24, 48, 72 y 96 horas) sobre la calidad espermática antes y después de la congelación.***

En este trabajo hemos obtenido el fluido epididimario mediante la introducción de aire por el vaso deferente en dirección retrogradas en todas las muestras utilizadas, lo que pone de manifiesto la eficacia y eficiencia del sistema que antes ha sido empleado para la obtención de espermatozoides de epidídimos porcinos (Matas et al., 2010). Diversos autores han usado métodos variados para obtener espermatozoides procedentes de epidídimo como la técnica de flotación mediante cortes realizados en el epidídimo, el lavado retrógrado epididimario con un medio a base de leche, aspiración, etc. (Garde et al., 1994; Sharma et al., 1997; Comizzoli et al., 2001; Cary et al., 2004). No obstante, la mayoría de estos métodos obligan a realizar una centrifugación posterior para poder reuspender la muestra en el medio de congelación y esto genera daño en la célula espermática (Matás et al., 2007).

En cuanto a la concentración espermática en el fluido epididimario se refiere, pudimos observar que la concentración determinada en nuestro estudio ( $4.7 \times 10^9$  espermatozoides/ml) fue similar a la descrita por diversos autores que utilizaron un lavado retrógrado con medios de cultivo ( $4.0$ ,  $4.6$  y  $4.5 \times 10^9$  espermatozoides/ml) (Jimenez, 1987; James et al., 2002; Cary et al., 2004) o bien un sistema de flotación ( $4.9 \times 10^9$  espermatozoides/ml) (Cary et al., 2004; Fioratti et al., 2008). Sin embargo, en otros estudios donde se aplicó un sistema de lavado retrógrado se obtuvieron muestras del

fluido epididimario mucho más concentradas en espermatozoides ( $12-30 \times 10^9$  espermatozoides/ml) (Bruemmer, 2006; Granemann et al., 2006; Monteiro et al., 2011), al igual que cuando se aplicó el sistema de flotación en epididimos de burro ( $9'8 \times 10^9$  espermatozoides/ml) (Gloria et al., 2011).

Estas diferencias en la concentración espermática obtenidas por diferentes autores podrían ser debidas a varios factores tales como diferencias en la madurez sexual, el volumen y el peso testicular, el reposo sexual, la frecuencia de obtención de semen y la edad del animal (Pickett et al., 1975; Johnson and Neaves, 1981; Blash et al., 2000; Fioratti et al., 2008; Gloria et al., 2011).

Un caballo adulto y sano en reposo sexual debería tener una concentración total de espermatozoides del orden de  $50-60 \times 10^9$  distribuidos en los conductos eferentes, conducto epididimario y el conducto deferente (Gebauer et al., 1974b; Bruemmer, 2006). Por otro lado, hay que tener en cuenta que el caballo es de reproducción estacional y en la temporada no reproductiva se modifica el patrón endocrino con un descenso en la concentración de testosterona en plasma (Berndtson et al., 1974) y se reduce el tamaño testicular y con este el volumen, la concentración espermáticas, etc (Pickett et al., 1970; Wrench et al., 2010).

La metodología empleada con el uso de aire en vez de medio presenta algunas ventajas sobre otros métodos anteriormente empleados (Bruemmer, 2006; Granemann et al., 2006; Monteiro et al., 2011). En terminos generales simplifica el proceso de obtención y evita la dilución de la muestra en el medio de recogida por lo que no es necesaria la posterior centrifugación para concentrar la muestra que podría dañar a los espermatozoides (Alvarez et al., 1993; Matás et al., 2007). Otra ventaja que presenta frente a los métodos de flotación es que evita el contacto de los espermatozoides con restos de sangre y células de los tejidos, que pueden dañar la calidad espermática.

Los resultados obtenidos por otros autores confirman que los espermatozoides procedentes de epidídimos conservados a  $4^{\circ}\text{C}$  durante distintos periodos de tiempo conservan su viabilidad durante varios días (James et al., 2002). Nuestro objetivo, era sin embargo, determinar si éste periodo de conservación afectaba a diferentes parámetros espermáticos tras la criopreservación.

Varios factores tienen efecto sobre la calidad de espermatozoides epididimarios cuando estos son conservados siendo el principal factor la temperatura. Se sabe que conservar los testículos y los epidídimos a bajas temperaturas ( $4^{\circ}\text{C}$ ) puede reducir el metabolismo y mantener la viabilidad. Por tanto, si se conservan éstos

órganos a baja temperatura, se pueden transportar las muestras al laboratorio, ser manipuladas y posteriormente criopreservar los espermatozoides contenidos en ellos (Martins et al., 2009).

Como primer factor a estudiar fue ver si el tiempo de conservación afectaba a la calidad espermática tras la dilución de los espermatozoides en el medio de congelación. Observamos que la viabilidad de los espermatozoides diluidos en el medio de congelación a 4°C durante 30 min se mantuvo con valores similares (entorno al 80%) durante las primeras 48 horas de conservación y que posteriormente la viabilidad decrecía (hasta el 67%) respecto del control. Sin embargo, cuando estos espermatozoides eran congelados-descongelados observamos que solo había diferencias significativas en cuanto a viabilidad para el grupo de 96 horas de conservación. Los resultados obtenidos para viabilidad durante la refrigeración a 4°C concuerdan con los obtenidos por James et al (2002) en la especie equina. Estos autores observaron que los espermatozoides conservados en el epidídimo se mantuvieron con una viabilidad superior al 65% después de 96 h de conservación. Resultados similares se observaron en la especie bovina en la que conservaron los epidídimos hasta 72 horas a 5°C presentando una viabilidad de los espermatozoides contenidos en él alrededor del 64% (Martins et al., 2009).

En nuestro estudio observamos que la viabilidad de los espermatozoides congelados era similar en todos los grupos de conservación 4°C entre 0 y 72 horas. No obstante es evidente que una vez que el espermatozoide entra en contacto con el medio de congelación ocurren cambios drásticos en la membrana plasmática (Parks and Graham, 1992) debido a una deshidratación parcial, penetración del crioprotector a las células, reorganización de proteínas y lípidos de membrana, exposición a elevadas concentraciones de sales y a cristales de hielo intra- y extracelulares (Hidalgo Ordóñez et al., 2005) que alteran las funciones y estructuras de estas células (Parks and Graham, 1992), las cuales son cruciales para el mantenimiento de la viabilidad y la capacidad del espermatozoide para interactuar con el ovocito durante la fecundación (Saravia et al., 2007).

En un estudio con espermatozoides ovinos (Tamayo-Canul et al., 2011) evidenciaron que al colocar los espermatozoides de epidídimo en el medio de congelación la viabilidad se reducía respecto de aquellos espermatozoides no incubados en este medio y argumentaron que posiblemente era debido a los cambios que se producen en la membrana plasmática del espermatozoide que conllevan a que los espermatozoides sean más vulnerables al estrés osmótico, sugiriendo que la osmolaridad del medio ejerce un papel complejo en la calidad espermática.

Por otra parte, se ha descrito que el principal daño que sufren los espermatozoides durante la criopreservación es debido a la formación extracelular de cristales de hielo (Mazur, 1984; Katkov et al., 1998; Koshimoto et al., 2000; Mazur and Koshimoto, 2002). A medida que va disminuyendo la temperatura se van formando los cristales de hielo en el medio extracelular y los espermatozoides se ven expuestos a una solución cada vez más hipertónica y consecuentemente se retraen hasta que se equilibran las concentraciones de solutos intra y extracelulares (Mazur, 1984; Holt, 2000). Este entorno hipertónico, en el cual los espermatozoides están expuestos, conlleva a una pérdida intracelular de agua y depende en su mayor parte de la tasa de enfriamiento que se utilice (Mazur and Koshimoto, 2002).

### **Viabilidad espermática**

Cuando descongelamos los espermatozoides, observamos que la viabilidad espermática no se encontraba afectada por el tiempo de conservación del epidídimo. En todos los grupos estudiados se encontraron valores próximos al 35% de vivos inmediatamente después de la descongelación y que esta viabilidad descendía a lo largo del tiempo de incubación posdescongelación (a los 120 minutos descendió al 15%). La explicación a estos resultados parece estar en el medio en que se encuentran resuspendidos los espermatozoides descongelados durante la incubación ya que pasamos de un medio hipertónico (medio de congelación) a otro hipotónico (medio de descongelación). Por tanto los espermatozoides están expuestos a un entorno hipotónico que causa un aumento del su volumen debido a la entrada de agua en el citoplasma. Este fenómeno sigue hasta que las concentraciones de soluto intra y extracelulares se equilibran (Peña et al., 2011). Durante el proceso de congelación-descongelación ocurren alteraciones en la membrana plasmática (Hidalgo Ordóñez et al., 2005) que están acompañadas por cambios físicos-químicos: la liberación de transaminasa glutámica oxalacética, la pérdida de lipoproteínas y aminoácidos, la disminución en la actividad de la fosfatasa, la liberación de colesterol, el aumento de  $\text{Na}^+$  y disminución de  $\text{K}^+$ , la inactivación de la hialuronidasa, la pérdida de prostaglandinas, la disminución de la síntesis de ATP y ADP y la disminución de la actividad proteolítica acrosomal (Salamon and Maxwell, 2000). Por tanto, el daño que sufren las células es doble: daño hiperosmótico, ocurrido durante el proceso de la congelación y daño hiposmótico, que sucede durante el proceso de la descongelación. Consecuentemente a este hecho también hay una doble modificación del volumen de la célula. Los trabajos realizados por (Pommer et al., 2002; Garcia et al., 2012) demostraron que estos cambios son más perjudiciales para el

espermatozoide de caballo que la exposición continua a una solución hiperosmolar. De manera que cualquier cambio dramático en el volumen del espermatozoide producido por cambios osmóticos durante la criopreservación, ya sea por exceder el límite mínimo durante la congelación o por un incremento excesivo del volumen durante la descongelación (volumen celular máxima), provocaría daños en diferentes partes del espermatozoide. Se han demostrado alteraciones en la membrana plasmática (Pommer et al., 2002), en el citoesqueleto (Correa et al., 2007; Gutierrez-Perez et al., 2011) y en las mitocondrias (Pommer et al., 2002).

En cualquier caso, a pesar de que la criopreservación cause daños irreversibles en la membrana plasmática que conlleva la muerte de un gran número de estas células garantiza la supervivencia de parte de los espermatozoides (Hidalgo Ordóñez et al., 2005). Así por ejemplo, Melo et al. (2008) después de conservar el epidídimo de caballo a 5°C durante 24 h, obtuvieron una viabilidad de 47'6% después de congelación-descongelación, mientras que al comparar dos razas de caballos (Tori y Estonian) observan una viabilidad postdescongelación entre (22'5 y 25'3%) (Kavak et al., 2003) En estos estudios ninguno de estos autores evaluó la viabilidad a lo largo del tiempo después de congelación-descongelación, algo que es sumamente importante ya que el espermatozoide permanecerá un periodo de tiempo en el tracto genital femenino después de la inseminación artificial antes de que se produzca la fecundación. En este sentido se ha demostrado que una baja viabilidad del espermatozoide durante la incubación posdescongelación se asocia con una escasa capacidad fecundante (England and Ponzio, 1996). En en condiciones in vivo el espermatozoide fresco de caballo es capaz de mantener su viabilidad y permanecer de 75 hasta 120 h en el tracto genital femenino (Johnson and Everitt, 1980).

### **Condensación cromatina**

Aunque la motilidad, la viabilidad y la morfología del espermatozoide son parámetros importantes en la interacción con el ovocito y la penetración del mismo, también el espermatozoide debe tener una cromatina resistente y sin alteración para obtener embriones viables (Dias et al., 2006; Reckova et al., 2008). En este estudio observamos que la condensación de la cromatina espermática no se vio afectada por el tiempo de conservación de los epidídimos. Sin embargo, el proceso de enfriamiento en el medio de congelación a 4°C durante 30 minutos y la congelación indujo un aumento significativo en la condensación de la cromatina en todos los grupos de estudio (desde 0 hasta 96 horas de conservación).

Estos resultados coinciden con los estudios realizados en la especie humana y en la especie porcina donde demostraron que la congelación y descongelación producen hipercondensación de la cromatina espermática (Córdova et al., 2001; Hammadeh et al., 2001; Córdova et al., 2002). Además, señalaron que la hipercondensación puede provocar retraso en la formación de pronúcleo masculino respecto a la del femenino y este hecho podrían ocasionar la muerte embrionaria temprana (Hammadeh et al., 2001).

En nuestra opinión, la hipercondensación de la cromatina podría estar asociada a tres factores principales; 1) el daño físico-químico de la cromatina, 2) el medio de congelación y por último, 3) la ausencia de antioxidantes en el medio de congelación. Si partimos de la base de que los espermatozoides procedentes de epidídimos conservados a 4°C durante 4 días de conservación no habían sido afectados por la temperatura pero si que lo fueron al entrar en contacto con el medio de congelación y su posterior incubación durante 30 min quizás sea consecuencia a la exposición del núcleo espermático a una alta concentración de iones la que haya provocado una desestabilización de la estructura de la cromatina durante el enfriamiento y congelación-descongelación. Por otro lado, la afluencia incontrolada de calcio después de la descongelación podría promover la degradación de nucleoproteínas y del ADN por activación de proteasas y nucleasas endógenas, afectando de esta manera la estructura física-química de la célula (Jager et al., 1983; Lymberopoulos and Khalifa, 2010; Martinez-Soto et al., 2011).

El núcleo espermático está rodeado por una estructura del citoesqueleto denominada teca perinuclear. La función de ésta estructura es dar estabilidad al núcleo e intervenir en la descondensación de la cromatina una vez que ocurra la fecundación (Mújica et al., 2003; Alvarez Sedó et al., 2009; Oko and Sutovsky, 2009). La proteína actina-F que se encuentra en el segmento ecuatorial de la cabeza espermática da estabilidad a la estructura de la teca perinuclear (Gutierrez-Perez et al., 2011) y se ha observado que la actina-F en espermatozoides frescos presenta distinta localización a la de espermatozoides descongelados, lo que sugiere que esta proteína también interviene en la descondensación de la cromatina y en el daño ocasionado a esta estructura proteica durante el proceso de congelación-descongelación lo cual podría repercutir en la capacidad fecundante del espermatozoide (Gutierrez-Perez et al., 2011).

Otra de las causas de la hipercondensación encontrada en las muestras diluidas en el medio de congelación podría ser la ausencia de antioxidantes en dicho medio. En estudios realizados sobre el proceso de congelación-descongelación

evidenciaron que desde el momento de la dilución de espermatozoides con el medio de congelación ya se producía la generación de ROS, lo cual se hace mucho más evidente durante el proceso de congelación-descongelación (Mazzilli et al., 1995). Este incremento de ROS provocaría daños en la membrana plasmática del espermatozoide por estrés oxidativa lo que conlleva a la peroxidación lipídica provocando fragmentación de ADN y la muerte celular (Mazzilli et al., 1995; Bilodeau et al., 2000).

Diversos estudios han puesto de manifiesto que durante el proceso de congelación-descongelación ocurre una reducción considerable de los niveles de los antioxidantes, lo que podría estar relacionado con un incremento de la susceptibilidad al daño del ADN (Evenson et al., 1994; Lasso et al., 1994; Bilodeau et al., 2000; Gadea et al., 2004; Gadea et al., 2011). Estas alteraciones de ADN quizás no sean lo suficiente para producir daños morfológicos considerables en las células espermáticas, pero sí podría ejercer un efecto perjudicial en la descondensación de la cromatina (Madrid-Bury et al., 2005).

### **Alteración acrosomal**

El acrosoma es una vesícula de secreción que se encuentra en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide cubriendo dos tercios del núcleo. Contienen numerosas proteínas necesarias para la interacción con el ovocito así como para el reconocimiento y la fusión de estas dos células (Meyers, 2009; Zoppino et al., 2012). Las modificaciones en la estructura del acrosoma no sólo se produce por procesos fisiológicos como el envejecimiento de la células o la fecundación (Zoppino et al., 2012), sino que también pueden producirse inmediatamente después de la obtención del espermatozoide, después del enfriamiento para la conservación espermática o después del proceso de criopreservación (Samper, 2009). Es de vital importancia valorar el estado acrosomal de las células espermáticas durante los procesos de congelación-descongelación, inseminación artificial (IA) y fecundación in vitro ya que el porcentaje de espermatozoides intactos con capacidad de sufrir reacción acrosómica nos proporciona información sobre la calidad del semen y la capacidad fecundante del macho (Purohit et al., 1999). Es evidente la necesidad de tener una cierta población de espermatozoides viables con el acrosoma intacto, después de la descongelación con la finalidad de lograr éxito en la fecundación (Kavak et al., 2003). Además, los espermatozoides que presentan daños acrosomal presentan una vida

relativamente corta con respecto a los espermatozoides con el acrosoma intacto (Cheng et al., 1996).

Por ello en este trabajo evaluamos mediante citometría de flujo y de forma simultánea la integridad del acrosoma y la viabilidad espermática en muestras congeladas-descongeladas. Observamos que el porcentaje de espermatozoides vivos con el acrosoma dañado o no, no se vio afectado por las horas de la conservación.

En nuestro trabajo el tiempo de conservación de los epidídimos no afectó a la viabilidad ni a la integridad acrosomal posdescongelación. Sin embargo, en otros estudios si que se ha visto afectado. Los resultados obtenidos en la especie bovina (Martins et al., 2009), que conservaron los epidídimo hasta 72 horas a 5°C donde evidenciaron que la integridad del acrosoma y la viabilidad se vieron afectadas tanto por la criopreservación como por el tiempo que los epidídimos fueron conservados. Igualmente al estudiar muestras ovinas procedentes de epidídimos conservados hasta 48 h a 5°C y tras la descongelación observaron que incrementaba el daño acrosomal a medida que pasaba el tiempo de conservación (Kaabi et al., 2003).

### **Generación ROS**

Las especies reactivas del oxígeno son moléculas generadas por la reducción parcial del oxígeno molecular ( $O_2$ ). Se producen fisiológicamente durante el metabolismo celular siendo su principal fuente biológica la respiración mitocondrial (Sanocka and Kurpisz, 2004).

En el tracto genital masculino los niveles fisiológicos de ROS juegan un papel importante en la fecundación, al participar durante el proceso de la capacitación espermática, la reacción acrosómica y la fecundación (Smith and Yanagimachi, 1989; de Lamirande et al., 1997a; Hunter and Rodriguez-Martinez, 2003; Ford, 2004). No obstante, una excesiva producción de ROS por parte del espermatozoide (Ball et al., 2001) o por contaminación con leucocitos (Baumber et al., 2002; Aitken and Baker, 2004) tiene un efecto perjudicial sobre la funcionalidad espermática.

Las principales especies reactivas de oxígeno son: Radical hidroxilo ( $HO^+$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), anión superóxido ( $O_2^-$ ), oxígeno singlete ( $1O_2$ ), peróxido (ROO) y ozono ( $O_3$ ) (Halliwell and Gutteridge, 1999; Baumber et al., 2003). De todas ellas, el anión superóxido ( $O_2^-$ ) parece ser el principal ROS generado por el espermatozoide de la especie equina, este tiene una vida muy corta ya que

rápidamente da lugar a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y este es el que desempeña el efecto citotóxico sobre el espermatozoide (Ball, 2008).

Sin embargo, no todos los ROS son radicales libres. Los radicales libres químicamente reaccionan con mucha facilidad porque contienen electrones desapareados, estos tienden a captar un electrón de moléculas estables con la finalidad de alcanzar su estabilidad electroquímica. Cuando el radical libre logra obtener el electrón que necesita, la molécula estable que lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón impar, de esta manera se inicia una reacción en cadena destruyendo las células espermáticas (Halliwell and Gutteridge, 1999; Sabeur and Ball, 2006; Sabeur and Ball, 2007).

Los resultados del presente trabajo muestran que la producción de ROS fue similar en los espermatozoides procedentes de epidídimos conservados a 4°C a lo largo del tiempo. Se sabe que el epidídimo ofrece un ambiente adecuado que facilita la supervivencia del espermatozoide durante un largo periodo de tiempo en condiciones fisiológicas (Cornwall, 2009). No obstante, en condiciones in vitro si se quiere alargar el tiempo de preservación, se deben conservar las muestras a una temperatura más baja, de ésta forma se prolonga la vida útil del espermatozoide. A la temperatura de 4°C la actividad metabólica del espermatozoide dentro del epidídimo es prácticamente nula (Lone et al., 2011) Estos datos coinciden con otros donde observaron que la integridad acrosomal en espermatozoides de epididimario de ciervos y corzo mejoraba considerablemente una vez que estos fueron conservados a bajas temperaturas (5°C) (Martinez-Pastor et al., 2005).

### ***Fosforilación de tirosina de las proteínas espermáticas***

En éste trabajo hemos utilizado la fosforilación de la tirosina como herramienta para evaluar la funcionalidad espermática después del proceso de la capacitación. En espermatozoides incubados en medio no capacitante observamos un nivel muy bajo (menos de 4%) de fosforilación en tirosina en el segmento sub ecuatorial en todos los tiempos de conservación y no se encontraron diferencias entre los diferentes grupos experimentales. No obstante, cuando los espermatozoides fueron incubados en el medio de capacitación (FIV-TALP con procaína) la fosforilación de tirosina se vio incrementada (>30%) en esta misma región.

Los resultados obtenidos previamente en espermatozoides de caballo en lo referente a la localización de la fosforilación de tirosina no coinciden con los

encontrados en este trabajo (Pommer et al., 2003). Estos autores principalmente encuentran la fosforilación en la pieza intermedia y en la pieza principal del flagelo. No obstante, este trabajo se realizó con semen fresco eyaculado capacitado durante 3 horas y en presencia de un agonista de AMPc y cafeína o metil  $\beta$ -ciclodextrina. Sin embargo, nuestros resultados sí que coinciden con los resultados obtenidos en la especie porcina (Tardif et al., 2001), donde los autores observaron en la región sub ecuatorial un incremento de la fosforilación. Además plantean que la localización de fosforilación en la región del acrosoma es importante ya que las proteínas presentes en estas regiones intervienen en la fecundación. Además plantearon que diferentes localizaciones de la fosforilación puede estar relacionadas con diversas funciones. Por ejemplo, la localización de la fosforilación en la cola está relacionada con la hiperactivación y la motilidad. Por otro lado, en la especie humana encontraron una correlación positiva del incremento de la fosforilación en la región de la cabeza del espermatozoide con la RA y la capacidad de penetrar en el ovocito (Barbonetti et al., 2010).

La criopreservación y la capacitación comparten varias características como la reorganización de la membrana plasmática, el incremento del nivel de calcio intracelular, la generación de especies reactivas de oxígeno y la adquisición de la capacidad de fecundar (Bailey et al., 2000). El proceso de criopreservación en sí, no induce la fosforilación de la tirosina aunque las proteínas de los espermatozoides criopreservados sí que son más propensos a fosforilar una vez que son incubados en medio de capacitación (Pommer et al., 2003). Por otro lado, se ha verificado que la adición de proteínas seminales reducen fosforilación de proteínas en espermatozoides sometidos a un choque frío o a congelación (Perez-Pe et al., 2002; de Andrade et al., 2012).

### ***Fecundación in vitro heteróloga: ICSI y FIV***

De manera general se sabe que la criopreservación del espermatozoide causa aproximadamente una disminución de un 50% de la viabilidad espermática debido a cambios de la temperatura y efectos osmóticos. También se producen cambios morfológicos, en la composición lipídica, alteración del flujo de calcio, integridad, fluidez y permeabilidad de la membrana plasmática de los espermatozoides. Además, requieren de una mayor cantidad de espermatozoides para la fecundación en comparación con el semen fresco (Thomas et al., 1998; Bilodeau et al., 2000).

Entre todas las pruebas que se han desarrollado para evaluar la funcionalidad espermática, la FIV probablemente sea la más adecuada para evaluar la calidad espermática (Gadea, 2005), ya que evalúa simultáneamente diferentes funciones del espermatozoide como: la motilidad, la RA, la penetración al ovocito y la descondensación de la cromatina. Por otro lado, se pueden detectar daños causados a la membrana plasmática durante la refrigeración a 5°C o la congelación que a menudo son difíciles de detectar en ensayos de laboratorio (Taberner et al., 2010). No obstante, realizar estudios para evaluar calidad espermática mediante FIV homóloga no siempre es posible.

Por esa razón, la fecundación heteróloga ha sido utilizado por muchos investigadores como herramienta para predecir la capacidad fecundante de los espermatozoides en diferentes especies (García-Alvarez et al., 2009; Clulow et al., 2010)Clulow, 2010#1873}, incluyendo la equina (Choi et al., 2002; Choi et al., 2003).

En este trabajo hemos realizado la ICSI y la FIV heteróloga para evaluar la calidad de espermatozoides descongelados procedentes de epidídimos conservados a 4°C. Los resultados nos mostraron que los espermatozoides fueron capaces de activar los ovocitos y formar pronúcleo en todos los grupos experimentales (0, 24, 48, 72 y 96 h). Sin embargo, el porcentaje de penetración fue muy bajo comparado con los resultados obtenidos por otros autores (Choi et al., 2003; Taberner et al., 2010). Una posible causa de esa baja tasa de penetración podría estar relacionada con diferentes patrones de capacitación del espermatozoide de epidídimo en comparación con el eyaculado, como ha sido demostrado anteriormente por (Matas et al., 2011). Además, en la especie equina solo una pequeña proporción de los espermatozoides de la cola del epidídimo son capaces de experimentar la capacitación y RA, incluso con el uso de agonistas como la progesterona, el ionóforo de calcio o un análogo de AMPc (Sostaric et al., 2008). No obstante, también se podría atribuir a no haber estado en contacto con el plasma seminal, el cual es un componente importante que desempeña un papel relevante sobre la motilidad del espermatozoide, la integridad de la membrana, el transporte espermático a través del útero etc.(Aurich et al., 1996; Katila, 2001). Este hecho explica, al menos en parte, la baja tasa de gestación obtenida y/o el gran número de espermatozoides que se requiere para lograr una gestación mediante inseminación artificial dependiendo de si son espermatozoides epididimarios frescos o congelados (Morris et al., 2002; Heise et al., 2010). Por otro lado, se ha demostrado que la tasa de penetración puede variar hasta más de un 40% dependiendo del medio utilizado (Choi et al., 2003). Tal vez, y a la luz de los resultados obtenidos, podría ser importante modificar y adaptar el medio

de capacitación para los espermatozoides de epidídimo, ya que estos medios se han desarrollado solamente para espermatozoides eyaculados.

Creemos que un hecho interesante fue que en todos los tiempos de conservación estudiados, los espermatozoides fueron capaces de activar al ovocito y formar pronúcleos (masculino y femenino). Eso demuestra la integridad de los factores necesarios que deben tener tanto el espermatozoide como el ovocito para que se lleve a cabo la fecundación.

Una isoforma de la fosfolipasa C llamada PLC $\zeta$  es un factor espermático sensible al calor y a las proteasas que ha sido señalado como responsables de la generación de IP $_3$  y la oscilación de Ca $^{2+}$ , y es ampliamente reconocido en la actualidad que la PLC $\zeta$  es responsable de la activación del ovocito y el desarrollo embrionario temprano (Yoneda et al., 2006; Grasa et al., 2008; Ito et al., 2011). También se ha demostrado que en los espermatozoides congelados y descongelados (un proceso que daña la membrana espermática), disminuye notablemente la cantidad de PLC $\zeta$  (Kashir et al., 2011).

### **Efecto del plasma seminal**

El efecto de la incubación de los espermatozoides con el PS en la especie equina es algo complejo ya que existen numerosos factores que afectan esta interacción. Un ejemplo de ellos lo tenemos en la gran variabilidad que existe entre machos debido a la concentración de proteína que posee el PS, el momento de la adición del PS antes o después de la congelación, la cantidad de PS, si es buen o mal congelador, el tiempo de incubación con el PS, etc. Todos estas variables contribuyen al efecto controvertido del PS sobre el espermatozoide durante la congelación y en la fecundación (Kareskoski et al., 2011; Leahy and Gadella, 2011). Se ha dado el caso de que el PS de algunos machos mejora la calidad espermática de otros machos, y viceversa. Igualmente, espermatozoides de algunos machos pueden ser más sensibles que otros a la presencia de PS (Kareskoski et al., 2006). Según (Braun et al., 1994) el PS tiene un efecto beneficioso sobre el espermatozoide epididimario pero disminuye la motilidad en espermatozoide eyaculado durante la refrigeración de espermatozoide de caballo. Asimismo plantearon que la congelabilidad del espermatozoide se determina antes de la congelación. Teniendo en cuenta todos estos criterios se ha visto en bastantes trabajos una gran controversia en cuanto a la utilización del PS sobre la calidad de los espermatozoides de epidídimo. Así, (Papa et al., 2008) en sus estudios después de la congelación no evidenciaron ninguna diferencia significativa al incubar los espermatozoides con PS o sin él ((28 y 32% de viabilidad respectivamente) después de haber conservado el epidídimo de caballo a 5°C durante 24 h. (Bruemmer et al., 2002) Tampoco apreciaron diferencias en la viabilidad y la integridad del acrosoma tanto en los espermatozoides de epidídimo incubados o no con PS.

Igualmente (Baumber et al., 2005) no observaron diferencias significativas al incubar diferentes antioxidantes presente normalmente en el PS como  $\alpha$ -tocoferol ( $29'8 \pm 4'9\%$ ) y ácido ascórbico ( $32'8 \pm 4'9\%$ ) con el control ( $36'6 \pm 4'9\%$ ), en espermatozoides procedentes de eyaculado. (Ball et al., 2001) Tampoco observaron ventaja en la utilización de la catalasa en muestras con y sin PS con respecto al grupo control, en cuanto a la viabilidad, integridad acrosomal y la motilidad.

(Baumber et al., 2005), por otro lado, creen que la razón por la cual la adición de antioxidantes al medio de congelación no mejoró las características de espermatozoides después de la congelación-descongelación podría sugerir que el daño de los espermatozoides durante la criopreservación puede ser resultado de un mecanismo que no sea únicamente por el estrés oxidativo, ya que el proceso de congelación-descongelación puede causar varias alteraciones estructurales y

funcionales, así como modificaciones fisiológicas en las células espermáticas o es posible que la yema de huevo presente en el medio de congelación proporcione suficiente protección antioxidante a los espermatozoides y la suplementación de más antioxidantes no proporcione beneficio adicional.

En este trabajo hemos querido averiguar si el tiempo de conservación de epidídimo a 4°C producía un cambio en la condensación de la cromatina espermática y en qué medida el plasma seminal modificaba la compactación durante la fase de enfriamiento y congelación

El plasma seminal posee diferentes componentes que pueden estabilizar la cromatina frente al daño por el proceso de la criopreservación. Por este motivo nos planteamos evaluar el posible efecto beneficioso del PS sobre la condensación de la cromatina. Los resultados nos mostraron que tras incubar los espermatozoides procedentes de epidídimo con PS durante 30 min a 4°C y posteriormente con el medio de congelación, se produce una hipercondensación de la cromatina. Además, al analizar el efecto según el macho del que se obtenía el PS observamos que existía una gran variabilidad. El PS procedente del semental "Udón" presentaba valores de condensación superiores a los espermatozoides que no habían sido expuestos al plasma, aunque, después de la congelación-descongelación se evidenció un ligero incremento en la descondensación de la cromatina en todos los grupos incubados con el PS con respecto a las muestras diluidas, asimismo el PS de ninguno de los machos empleados tuvo efecto sobre los espermatozoides con relación al grupo control después de la congelación-descongelación.

(Saravia et al., 2009) obtuvieron resultados parecidos a los presentes en este trabajo, estos autores observaron una hipercondensación de la cromatina en la fase de enfriamiento y después de la congelación-descongelación y atribuyeron este hecho a la posibilidad de que el efecto biológico del PS en la fase de enfriamiento se limita únicamente a funciones cinemáticas del espermatozoide ya que valoraron la motilidad y la condensación de la cromatina antes y después de la congelación-descongelación. Sin embargo el PS sólo tuvo efecto positivo sobre la motilidad después de la descongelación pero no sobre el estado de condensación de la cromatina. No obstante, en este trabajo, después de la congelación-descongelación espermática sí que hemos observado un ligero incremento de la descondensación de la cromatina en los espermatozoides que habían sido incubados con plasma seminal lo que nos lleva a pensar que el PS sí que tuvo un efecto positivo. Este resultado era esperado ya que en condiciones fisiológicas el PS estabiliza la cromatina y por otro lado facilita la descondensación tras la descongelación. Además observamos que

estos resultados eran más evidentes cuando utilizábamos el PS procedentes de los sementales "Ojeado" y "Faraón", los cuales habían demostrado previamente que eran "buenos congeladores"

### **Análisis de la composición de ácidos grasos, antioxidante y proteínas presenteen el plasma seminal**

#### **Análisis de ácidos grasos del plasma seminal**

La fluidez de la membrana plasmática del espermatozoide demuestra el funcionamiento normal de esta célula y depende principalmente de la composición de los lípidos (Macías García et al., 2011). La reducida fertilidad del espermatozoide descongelado se atribuye a la alteración de la estructura y función de la membrana espermática durante el enfriamiento y la descongelación consecuencia de la reorganización de los lípidos y las proteínas de dicha membrana (Parks and Graham, 1992). Los espermatozoides poseen un metabolismo activo de lípidos y una alta concentración de ácidos grasos libres en el PS lo que, junto con la concentración de carnitina, indica claramente que los lípidos son unas de las fuentes más importantes de energía en el metabolismo de las células espermática. El PS normalmente actúa como un medio nutritivo y protector de los espermatozoides por el alto nivel de antioxidantes que posee aunque, al mismo tiempo, puede volverse un medio hostil cuando ocurre alguna alteración del equilibrio anti/pro-oxidante o cuando la membrana del espermatozoide es más frágil en condiciones naturales, algo que podría ser un desequilibrio en la composición de ácidos grasos polinsaturado o como consecuencia de la manipulación in vitro (Lenzi et al., 1996).

Otros investigadores (Aitken et al., 2006; Khosrowbeygi and Zarghami, 2007; Macías García et al., 2011) han correlacionado SFA y MUFA con mala calidad seminal. Igualmente (Lenzi et al., 1996; Fleisch and Gadella, 2000) consideran que los SFA incrementan la rigidez de la membrana. Hemos mencionado anteriormente que en nuestro estudio la mayor cantidad de PUFA lo registró el ácido eicosapentanoico "20:5n-3" (W-3),  $\gamma$ -linoleico "18:3n-6" (W-6) y diomo- $\gamma$ -linoleico "20:3n-6" (W-6), este último ha registrado el valor más alto, sobre todo en el macho Faraón. Estos resultados coinciden con los estudios realizados en humano por (Safarinejad et al., 2010) donde observaron que los niveles altos de eicosapentanoico (20:5n-3) están correlacionados con la fertilidad. De esta manera estos autores hicieron hincapié en la suplementación de PUFA en la dieta, sobre todo de omega-3. Asimismo el ácido  $\gamma$ -linoleico (18:3n-6) y el ácido diomo- $\gamma$ -linoleico (20:3n-6) se han observado en los niveles más altos en

espermatozoides de machos fértiles (Lenzi et al., 1996). Además se ha demostrado que los ácidos grasos polinsaturados dan mayor fluidez y flexibilidad a la membrana (Lenzi et al., 1996; Flesch and Gadella, 2000).

Por otro lado (Macías García et al., 2011) en sus estudios evidenciaron en la membrana plasmática de espermatozoides de caballo que los ácidos grasos C16:0 (palmítico), C18:0 (esteárico), C20:0 (araquídico), C16:1 n-7 (palmitoleico), C18:1 n-7 (cis-vaccénico), C23:0 (tricosanoico), C22:4 n-6 (docosatetraenoico) y C22:6 n-3 (docosohexaenoico) están correlacionados con una baja calidad espermática y membrana espermática intacta. Igualmente correlacionaron negativamente los SFA con los espermatozoides vivos y membrana plasmática intacta. También se encontraron correlaciones positivas entre C18:0 (esteárico) y el porcentaje total de SFA con la peroxidación lipídica (LPO). Los PUFA de los espermatozoides vivos, sobre todo con el ácido C22:5 n-6 (docosapentanoico) están correlacionados positivamente con altos niveles de antioxidante en el PS (SOD y catalasa) (Safarinejad et al., 2010).

### ***Electroforesis diferencial en gel de dos dimensiones (2D-DIGE)***

Las técnicas de proteómica, como la electroforesis diferencial en gel de dos dimensiones (2D-DIGE) y la electroforesis en gel de poliacrilamida (2D-PAGE), junto con la espectrometría de masas (MS), han permitido la identificación de numerosas proteínas específicas del espermatozoide y del plasma seminal (Hamada et al., 2013). Estas técnicas pueden ayudar a reconocer proteínas implicadas en procesos de las funciones espermáticas específicas como la motilidad, la capacitación, reacción del acrosoma, y la fecundación

La contribución de las proteínas del plasma seminal a la congelabilidad se ha demostrado en varias especies como la bovina (Jobim et al., 2004; Bergeron et al., 2007; Manjunath et al., 2007), ovina (Barrios et al., 2000), búfalo (Harshan et al., 2006; Asadpour et al., 2007) o la porcina (Casas et al., 2009). Sin embargo, la información sobre la importancia de las proteínas del PS de caballo en relación con la congelabilidad son limitadas (Novak et al., 2010; Jobim et al., 2011; Kareskoski et al., 2011) aunque previamente hayan sido identificadas numerosas proteínas del PS que participan en la criopreservación espermática (Jobim et al., 2011). Bajo nuestro conocimiento no se ha realizado hasta la fecha un estudio del perfil proteico del PS de caballo comparando el PS de varios animales en el mismo gel.

Para identificar y comparar las proteínas del PS de diferentes sementales hemos utilizado la técnica 2D-DIGE y posteriormente hemos valorado su relación con la congelabilidad de los espermatozoides epididimarios. En primer lugar nos planteamos investigar el perfil proteico del PS de los tres machos utilizados en este trabajo y así, en base a la buena o mala congelabilidad espermática aportada por los PS que se habían utilizado, averiguar cuál de ellos presentaban proteínas que de alguna manera interviniesen en la protección de los espermatozoides epididimarios durante la criopreservación.

Las proteínas obtenidas mediante análisis proteómico en el PS de sementales empleados en esta tesis, son proteínas que presentaron mayor abundancia en el PS del macho correspondiente, por tanto, existe una alta probabilidad de que estas proteínas hayan desempeñado un importante papel en los espermatozoides durante la incubación del PS con los espermatozoides.

Para una mejor comprensión, discutiremos en conjunto las proteínas identificadas.

### ***Proteínas ricas en cisteína y proteínas de plasma seminal de caballo “CRISP-3 y HSP-3”***

Las proteínas secretadas ricas en cisteína de la familia CRISP se expresan predominantemente en el tracto reproductivo masculino y están implicados en el proceso de la espermatogénesis, la maduración posttesticular del espermatozoide, en la capacitación, la unión espermatozoide-ovocito, y posiblemente también la penetración de la zona pelúcida (Magdaleno et al., 1997). Los roedores expresan únicamente 2 proteínas CRISPs (CRISP-1 y CRISP-2) en su sistema reproductivo masculino, mientras que los humanos y los caballos expresan un tercer miembro adicional denominado CRISP-3 (Udby et al., 2005). Estas proteínas se caracterizan por tener un alto contenido en cisteína (16 de un total de 220-230 aminoácidos) lo que permite la formación de 8 puentes disulfuro intramoleculares (Eberspaecher et al., 1995)

La proteína CRISP-3 se encuentran entre las más importantes de la especie equina (Calvete et al., 1994; Magdaleno et al., 1997; Schambony et al., 1998; Jobim et al., 2011). Son producidas por las glándulas accesorias y se presentan en elevada concentración (1mg/ml) en el plasma seminal. La proteína HSP-3 es un miembro de la familia CRISP (Magdaleno et al., 1997).

Los estudios realizados por (Novak et al., 2010) relacionan la presencia de la proteína CRISP-3 con la fertilidad de forma positiva y está relacionada con la tasa de gestación en la primera cubrición. Por otra parte (Doty et al., 2011), determinaron que esta proteína CRISP-3 interviene en la interacción del espermatozoide con el ovocito y que presenta un papel importante en la protección de los espermatozoides contra los polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) en el tracto genital de la hembra.

(Jobim et al., 2011) hicieron un estudio comparativo mediante la técnica de 2D-PAGE del perfil proteico del PS de caballos de alta y baja congelabilidad en el cual detectaron la presencia de CRISP-3 en ambos PS pero con diferentes pesos moleculares (80 kDa vs. 25 kDa, PI 7'54). Esta diferencia se podría atribuir a que la CRISP-3 es una proteína que se expresa a lo largo del tracto genital masculino (Schambony et al., 1998), por lo que es probable que tenga diferentes masas moleculares (Topfer-Petersen et al., 2005).

Por otro lado, (Jobim et al., 2004) no detectaron diferencias significativas de CRISP-3 en el PS de estos machos de alta y baja congelabilidad. Estos autores opinan que la causa de estas diferencias puede ser atribuida a los diferentes polimorfismos que pueden presentar los genes que codifican esta proteína. En cambio, estos mismos autores al comparar el perfil proteico de PS de buenos y malos congeladores de la especie bovina identificaron 4 proteínas distintas de bajo peso molecular que oscila entre (10-30 kDa) mediante la técnica de 2D-PAGE que se han correlacionado positivamente con la congelabilidad. Igualmente, (Asadpour et al., 2007) determinaron una proteína de 24'5 kDa en el PS de búfalo relacionada con la motilidad progresiva del semen fresco y la viabilidad del semen congelado-descongelado, por lo que también está relacionada con la congelabilidad. Por otro lado, en la especie ovina se han analizado diversas proteínas del plasma seminal que podrían estar relacionadas con la protección al choque frío y a la capacidad de congelación (Barrios et al., 2000; Perez-Pe et al., 2002; Barrios et al., 2005; Cardozo et al., 2006). Todo lo descrito anteriormente apoyaría la idea de que las proteínas, independientemente de la especie de procedencia, pueden tener una homología con otras proteínas y desempeñar funciones similares (Killian et al., 1993).

### **Spot M02, Receptor de la inmunoglobulina polimérica "pIgR"**

La pIgR es una proteína integral de la membrana sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso de 80 kDa. Es liberada en forma de vesícula a la superficie basolateral, donde se une a las IgA, producidas por las células plasmáticas (Kaetzel,

2005). La función de la plgR es mediar la transcitosis o transporte transcelular de IgA e IgM poliméricas en las secreciones externas, asegurando así una eficiente secreción de estas inmunoglobulinas en la superficie de las mucosas. Sin la expresión de plgR las inmunoglobulinas no ejercerían sus funciones contra los patógenos (Phalipon and Corthésy, 2003).

No hemos encontrado ninguna referencia en la bibliografía que haga mención de un posible efecto de esta proteína en la congelación. En todo caso, en esta tesis el receptor de la inmunoglobulina polimérica (83 kDa, PI 5'68) alcanzó un mayor nivel de expresión en el macho Alegre. (Rümke, 1974) cree que las células epiteliales secretoras de la próstata están involucradas en la acumulación de inmunoglobulinas en el semen, al observar el incremento de niveles de IgM en pacientes con hiperplasia benigna de la próstata, siendo las inmunoglobulinas poliméricas (IgA y IgM) las primeras líneas defensivas inmunológicas del organismo (Kaetzel, 2005). Asimismo, (Rümke, 1974) certificó que el alto nivel de esta proteína podría deberse a una infección local, ya que la IgA se puede producir localmente. Estos resultados nos llevan a suponer que probablemente en el momento de la obtención del semen, el animal podría estar cursando algún proceso patológico en el tracto genital que provocaría una respuesta de defensa por parte del organismo incrementando el nivel de este antígeno (plgR).

También se demostró que la unión de IgA a plgR induce transducción de señales intracelulares que conducen a la activación de la proteínquinasa C (PKC) y la liberación de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), induciendo un incremento masivo de calcio del medio extracelular (Luton et al., 1998), además de la activación de la proteína fosfolipasa C-gamma1. Estos autores, con el objetivo de confirmar esta hipótesis, utilizaron un inhibidor de la proteína quinasa C como la genisteína (un competidor de ATP) que inhibe la transcitosis de plgR y bloquea el incremento de la fosforilación de la tirosina inducida por la IgA (Luton et al., 1998). Por lo tanto, estas observaciones nos llevaron a suponer que la presencia de este antígeno (plgR) en el PS probablemente provoque una capacitación prematura del espermatozoide ya que existe la evidencia de que la fosforilación de tirosina interviene en la capacitación (Visconti and Kopf, 1998).

### **Spot M03, Precursor de albúmina sérica**

La albúmina es una proteína presente en la sangre y su concentración en el PS sólo puede ser posible debido a una trasudación de la sangre al semen. Este hecho es

posible por mediación de las células epiteliales de la próstata, motivo por el cual se considera que la albúmina presente en el PS se origina normalmente de la próstata (Lindholmer et al., 1974; Rümke, 1974). Sin embargo, otros autores (Orlando et al., 1988; Elzanaty et al., 2007) sugirieron que la albúmina presente en el PS también puede provenir de los túbulos seminíferos.

La aparición de albúmina sérica en el PS puede ser debida a la presencia de un exudado inflamatorio debido alteraciones en el tejido (Bennett, 1965). No obstante, con la información que disponemos no se puede asignar una causa en concreto como responsable de la mayor expresión de esta proteína en el PS de Alegre, aunque todo apunta a una posible alteración en el tracto genital masculino, principalmente en la próstata. Sin embargo, correspondería interpretar el papel que juega la alta presencia de esta proteína en el PS y en la congelación.

En investigaciones previas, se ha demostrado que el 70% de las proteínas del PS de caballo son de bajo peso molecular (14-30 kDa) (Kareskoski et al., 2011) y en la mayoría de los estudios realizados, estas proteínas también se relacionaron con la fertilidad (Topfer-Petersen et al., 2005) y con la congelación, por lo tanto, esto apoyaría la idea de que, si hay un incremento en la expresión de proteínas de alto peso molecular, probablemente estarían afectando la conservación de los espermatozoides (Kareskoski et al., 2011). Asimismo, otros autores con resultados parecidos a los nuestros (Kareskoski et al., 2011), obtuvieron proteínas de alto peso molecular (60-70 kDa) en el PS de baja calidad. Igualmente (Jobim et al., 2011) en sus estudios detectaron la mayor expresión de lactoferrina (75'4 kDa, pl 6'9-7'4) en el PS de baja congelabilidad. (Buckett et al., 1997) correlacionaron las proteínas de alto peso molecular con una oligospermia y oligoastenozoospermia en la especie humana.

#### **Spots M05, M06, M21, M23, M30 y M31, Calicreína**

Existen dos isoformas de calicreína en mamíferos: uno que pertenece a la calicreína plasmática, que es una enzima compleja que se encuentra en el plasma sanguíneo, y otro, al que pertenece la calicreína tisular o glandular, presente en muchos órganos y fluidos corporales (Yvonne Olsson et al., 2004). Las calicreínas son miembros de la familia de la proteasa serina, que intervienen en numerosas funciones fisiológicas como en la coagulación de la sangre y fibrinólisis, la fecundación o la producción de hormonas (Carvalho et al., 2002).

En el sistema reproductor masculino, la calicreína glandular (antígeno específico prostático "PSA") es una proteína secretada por el epitelio prostático que participa en la lisis del coágulo seminal al degradar la semenogelina I y II y la fibronectina. Estas son proteínas producidas por la vesícula seminal y responsables de la coagulación del semen atrapando a los espermatozoides. En cambio, la calicreína interviene licuando el coágulo mediante proteólisis, obteniendo fragmentos más pequeños y solubles, liberando así a los espermatozoides (Robert et al., 1997; Lamirande et al., 2001; Carvalho et al., 2002) lo que facilita la motilidad de los mismos.

Sin embargo, una mayor expresión de esta proteína se correlaciona con procesos inflamatorios de la próstata, hiperplasia benigna, cáncer de la próstata, etc (Henttu and Vihko, 1994). En la especie equina la calicreína de la próstata comparte una extensa secuencia con el antígeno específico prostático humano (PSA), considerándose como el marcador más útil para diagnóstico y pronóstico de cáncer de próstata (Jobim et al., 2011).

En relación al efecto de las proteínas del plasma seminal sobre congelabilidad espermática, nuestros resultados en parte son coherentes con los estudios realizados por (Jobim et al., 2011) donde comparan el PS de buenos y malos congeladores. La calicreína detectada por estos autores obtuvo mayor expresión en PS de baja congelabilidad. (Kareskoski et al., 2011) Sin embargo, no observaron ninguna diferencia al comparar PS de machos fértiles y subfértiles ya que observaron la presencia de calicreína o PSA en ambas muestras. Igualmente (Novak et al., 2010) en la tentativa de identificar proteínas de PS que podrían servir como biomarcadores de la calidad de semen y de la fertilidad, observaron la presencia de dos spots de proteína que correspondían a la calicreína y esta se correlacionó negativamente con la tasa de gestación. Uno de los spot se correlacionó positivamente con el volumen seminal y el otro spot negativamente con la concentración. De esta forma estos autores sugirieron que quizás el volumen de PS y las secreciones de la próstata pueden tener una relación inversa con la fertilidad, al verificar que los machos que producían mayor concentración de espermatozoides y menor cantidad de PS tendrían mayor capacidad fecundante. Aunque ellos infieren que una mayor actividad secretora de las glándulas accesorias producen grandes volúmenes de eyaculado y eso podría no ser beneficioso.

Por otro lado, en nuestro trabajo a parte de valorar las proteínas de forma individual, también se ha analizado la presencia de ellas en su conjunto, de esta forma nos lleva a un mejor entendimiento e interpretación de estos resultados. Dicho esto, se puede observar que cuando se compara el PS de Alegre con Faraón se aprecia que

la mayoría de las proteínas que presenta el PS de Alegre están relacionadas con alguna alteración o proceso patológico, sin embargo, las proteínas presentes en el PS de Faraón están relacionadas con la fertilidad y la congelabilidad. Por el contrario, cuando se hizo una comparación entre el PS de Alegre con el PS de Ojeado, este último demuestra tener mayor expresión de calicreína que el PS de Alegre. Sin embargo, cuando observamos la otra proteína detectada en el PS de Ojeado (trombospondina tipo I) no está correlacionada con ningún proceso patológico, por lo que cabría la posibilidad de que la calicreína en Ojeado sí este relacionada con fertilidad y calidad seminal.

### **Spots M09, M12, M13, M14 y M16, Plasma seminal de caballo "HSP-1"**

Como comentábamos en la revisión bibliográfica, las proteínas HSP-1 y HSP-2 (también llamadas SP-1 y SP-2) se identificaron como las principales proteínas del plasma seminal de caballo (Saalman et al., 2000; Ekhlesi-Hundrieser et al., 2005). Cabe recordar que esta familia pertenece al grupo de la fibronectina tipo II (Fn-2), que tiene una gran capacidad de interacción con los fosfolípidos de la membrana de los espermatozoides y también con la heparina presente en el tracto genital de la hembra (Calvete et al., 1997). Las proteínas HSP-1 y HSP-2 son las proteínas que más abundan en el plasma seminal de caballo representando el 70-80% de proteínas totales y se cree que son similares a las principales proteínas en la especie bovina con afinidad a heparina (Ekhlesi-Hundrieser et al., 2005).

En nuestro trabajo hemos identificado diferentes spots que pertenecen a la proteína HSP-1. Esta tuvo mayor expresión en PS de Faraón. Los resultados nos llevan a suponer que la proteína HSP-1 de alguna manera interviene en la protección de los espermatozoides de epidídimo durante la congelación de los mismos, partiendo de la base de que fisiológicamente actúan como factor decapacitante evitando así una reacción acrosómica prematura (Ekhlesi-Hundrieser et al., 2005). Vale la pena hacer hincapié en que el efecto decapacitante de las proteínas se encuentra asociado a su estructura y a la cantidad de la misma.

Como se comentó anteriormente, la HSP-1 muestra una amplia similitud con las principales proteínas de unión a heparina del PS bovino (BSP-A1, A2, A3, 30kDa) (Calvete et al., 1995). Estas proteínas tienen mayor facilidad para interactuar con la heparina secretada en grandes cantidades en el oviducto y en el fluido uterino en la fase folicular de la yegua interviniendo así en la capacitación y por consiguiente en la fecundación (Manjunath and Thérien, 2002). Por ese motivo creemos que nuestros

resultados son, en parte, coherentes con los de (Brandon et al., 1999), que correlacionaron positivamente la proteína HSP-1 (72 kDa, pl 5'6) con la fertilidad. Sin embargo, se puede apreciar que la HSP-1 obtenida en nuestro trabajo (13 kDa, pl 8'14; 19 kDa, pl 7'91; 18 kDa, pl 7'51) presenta diferentes pesos moleculares, al igual que la proteína obtenida por (72 kDa, pl 5'6) (Brandon et al., 1999). (Calvete et al., 1995) realizaron un análisis estructural de HSP-1 donde demostraron que dos isoformas de HSP-1 presentaban una cadena de polipéptidos bioquímicamente idénticas pero con diferente nivel de glicosilación. Entendiéndose por glicosilación, un proceso de adición de carbohidratos a una proteína que produce cambios moleculares en la estructura de la misma. El contenido de carbohidratos podría variar hasta un 90% (Apweiler et al., 1999), modificándole así el peso molecular. Además (Barrabés et al., 2010) planteó que la glicosilación puede modificar tanto el peso molecular como el pl de una proteína o ambas cosas lo que podría explicar las diferencias que existen entre ambos resultados.

Otros autores con resultados diferentes a los nuestros (Jobim et al., 2011) realizaron un estudio comparativo de PS de machos de alta congelabilidad y de baja congelabilidad donde la proteína HSP-1 (13'9 kDa, pl 3'8-4'2) obtenida en sus trabajos tuvo mayor expresión en PS de machos de baja congelabilidad. Sin embargo, la HSP-2 (18'2 kDa, pl 5-5'2) se detectó en el PS de alta congelabilidad siendo las dos proteínas (HSP-1 y HSP-2) miembros de la misma familia. Estos autores sugieren que probablemente la HSP-1 tuvo un grado de glicosilación diferente que podría influir en la actividad de unión a heparina y también podría influir en las funciones de otras proteínas, como lo demuestra el análisis de la secuencia de N-terminal de la proteína unida a heparina de 30 kDa "HSP-1" y 25 kDa "HSP-2", donde se verificó que las dos proteínas pertenecían a la misma familia de proteínas, sin embargo la HSP-1 contenía una cadena larga de 15 aminoácidos de N-terminal (Calvete et al., 1995). En cierta medida puede que desempeñen funciones diferentes.

Nuestro resultado en parte coincide con el obtenido por (Kareskoski et al., 2011) quienes evidenciaron que tanto la proteína HSP-1 como la HSP-2 (< 30 kDa) se encontraban prácticamente en todas las fracciones del semen (sobre todo la HSP-1), y también se correlacionaban con la concentración. Ellos sugieren que la HSP-1 al ser juntamente con la HSP-2 las proteínas que más abundan en PS, intervienen en la protección y posteriormente en la capacitación.

Por otro lado, estos resultados difieren de los obtenidos por (Novak et al., 2010). Estos autores realizaron un estudio in vivo con el objetivo de detectar proteínas marcadores de la fertilidad y observaron que la proteína HSP-1 (14 kDa) tuvo una correlación negativa con la fertilidad. Estos autores sugirieron que probablemente una

de las causas podría ser la correlación positiva de esta proteína con un elevado volumen de PS, ya que al incrementar el volumen disminuye la concentración de espermatozoides (correlacionado positivamente con la gestación), y viceversa. Por ese motivo, varias proteínas como la calicreína, HSP-1, HSP-2 y la clusterina no pudieron relacionarse positivamente con la fertilidad, pese a ser características de la fertilidad.

(Frazer and Bucci, 1996b), utilizando también la mediante la técnica de 2D-PAGE, obtuvieron resultados diferentes a los nuestros ya que detectaron en 14 muestras de PS de caballo la presencia de dos spots con varios puntos en todas las muestras. Dos proteínas que se identificaron como la HSP-1 (21'6 kDa, pI 4'89) y la HSP-2 (18'2 kDa, pI 6'89). Estos dos puntos representaron más de un 90 % total de las proteínas presentes en 5 geles. Estos autores encontraron una similitud de la proteína HSP-2 con una proteína BSP bovina (17'5 kDa, pI 5'55). Sin embargo, no observaron ninguna correlación de la HSP-1 con la BSP bovina. Por lo tanto, sugirieron que probablemente sea una proteína especie específica. Además, observaron que el pI 4'89 de la HSP-1 es similar al de la proteína ácida bovina de 26 kDa que tiene un pI entre 4'2-4'8, pero es varios kilodaltons más pequeña (21'6 kDa). Por ese motivo creen que esta diferencia también podría deberse a una reducción en el nivel de glicosilación que podría ocasionar una disminución en el peso molecular y un incremento en el pI de estos polipéptidos, realizando de esta manera funciones diferentes. Al menos en la especie bovina se ha demostrado que la BSP presenta una heterogeneidad de carga, esto quiere decir, que varias proteínas pueden tener el mismo peso molecular pero con diferentes pI y realizar funciones diferentes.

#### **Spot M18, Proteína 5 asociada a la remodelación de la matriz "MXRA5"**

La proteína 5 asociada a la remodelación de la matriz (matrix-remodeling-associated protein 5 "MXRA5"), también conocida como Adlican, es un proteoglicano de adhesión de alto peso molecular (312-kDa) que pertenece a la familia de genes MXRA (MXRA1, MXRA2, MXRA3, MXRA4, **MXRA5**, MXRA6, MXRA7 y MXRA8) implicadas en la remodelación de la matriz extracelular y también interviene en la unión celular (Walker and Volkmuth, 2002; Xiong et al., 2012; Wang et al., 2013). Los proteoglicanos son moléculas que se encuentran en grandes cantidades en la matriz extracelular y en la superficie de las células realizando múltiples funciones biológicas como la organización y remodelación de la matriz extracelular, transferencia de señales de la membrana celular, cicatrización de las heridas, morfogénesis, migración celular (Götting et al., 2002) o reparación de los tejidos. Pero también desempeñan un

importante papel en situaciones patológicas, considerándose claves para muchas enfermedades como el crecimiento de las células tumorales, las infecciones virales (Götting et al., 2002), cardiomiopatías, artritis, angiogénesis, necrosis del pie diabético, aterosclerosis, fibrosis, ulceración y cáncer, igualmente en cartílago de pacientes con osteoartritis la MXRA5 muestra una elevada expresión en el (Walker and Volkmuth, 2002).

La función de los proteoglicanos en el PS no está clara del todo, aunque por la afinidad que tienen con los glucosaminoglicanos, se considera que desempeñan un importante papel en la fecundación en mamíferos, ya que se cree que están involucrados funcionalmente en la motilidad de los espermatozoides, en la inducción de la reacción acrosómica, y por consiguiente en la capacitación (Götting et al., 2002). Sin embargo, varios investigadores han correlacionado una mayor expresión de este proteoglicano con degradación de la matriz extracelular, que juega un papel fundamental en el soporte estructural de las células. Por ejemplo, (Buckanovich et al., 2007) mediante la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (PCR-RT) demostraron que la MXRA5 se sobreexpresa en el cáncer de ovario en comparación con ovarios normales y que está implicada en la angiogénesis tumoral. Así mismo, demostraron la ausencia de expresión de MXRA5 en casi todos los tejidos normales de colon. Igualmente (Wang et al., 2013) mediante la técnica de inmunohistoquímica observaron que las células presentes en el cáncer colorectal son las responsables de la sobreexpresión de MXRA-5. Además, el nivel de expresión de la MXRA5 incrementó considerablemente de un adenoma colorectal a un carcinoma. Estos autores concluyen en sus estudios que esta proteína tiene un valor potencial como biomarcador para la detección temprana de cáncer colorectal y metástasis de epiplón.

En nuestro trabajo la MXRA5 (31 kDa, pl 8'62) tuvo una mayor expresión en PS del macho Alegre con respecto al PS de Faraón. En todo caso, la presencia de esta proteína invita a pensar en una posible alteración en el tracto genital masculino como la prostatitis crónica o adenoma de la glándula de la próstata que podría facilitar el incremento de esta proteína mediante la transudación de suero a semen (Tauber et al., 1975). En cierto modo este resultado no nos sorprende del todo, ya que hemos detectado varias proteínas en PS de este macho que nos conducen casi siempre a la misma conclusión que sugiere la posible existencia de alguna alteración. Por ejemplo, la mayor expresión del receptor de la inmunoglobulina polimérica relacionado con problemas genitales por servir de receptor a la IgA e IgM que ejercen la primera línea defensiva (Kaetzel, 2005), el precursor de la albúmina sérica, que según las informaciones que hemos podido recopilar en nuestro trabajo un considerable

incremento podría ser por una hiperplasia de la próstata o enfermedades que provoquen una transudación de esta proteína de alto peso molecular al plasma seminal (Tauber et al., 1975), así como con alto nivel de expresión de la proteína calicreína también correlacionada con hiperplasia benigna y cáncer de próstata, etc (Henttu and Vihko, 1994) y, por último, con la presencia de la proteína MXRA5.

Por otro lado, se puede observar que existe una gran diferencia entre el peso molecular de esta proteína obtenido en este trabajo (31 kDa) con respecto al encontrado en la bibliografía 312 kDa. La MXRA5 normalmente se considera una proteína de alto peso molecular (312 kDa). Sin embargo, se han visto diferentes pesos moleculares de proteínas que pertenecen a esta familia. Por ejemplo: MXRA2 42 kDa (Olski et al., 2001) o MXRA4 "c1q", de la cual se han identificado tres receptores con diferentes pesos moleculares 33 kDa, 56 a 72 kDa y de 100 a 120 kDa (Lozada et al., 1995). Una posible explicación podría ser que los proteoglicanos están constituidos por una población heterogénea en lo que a masa molecular se refiere, por lo tanto existen proteoglicanos de diferentes formas y tamaños (grandes y pequeños) (Ruoslahti, 1989).

#### **Spot M29, *Thrombospondin type-1 domain-containing protein 7B* "THSD7B"**

La trombospondina tipo 1 (TSP-1) es una glicoproteína homotrimérica de alto peso molecular (150 kDa) secretada por diferentes tipos de células, como fibroblastos, macrófagos, células musculares lisas vasculares y células endoteliales. Forma parte de la matriz extracelular mediando la interacción entre células y está presente en los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas (Martínez-González, 2005). La familia de TSP se compone de cinco miembros (TSP1, TSP2, TSP3, TSP4 y TSP5). Cada una de estas proteínas es codificada por un gen independiente (Liau et al., 2008). La TSP1 es miembro de la familia más estudiada (Martínez-González, 2005). Tiene una estructura modular con varios dominios. Un dominio de unión a heparina, un dominio de oligomerización, un módulo tipo procolágeno, tres secuencias repetitivas tipo I, tres secuencias tipo EGF, un dominio de unión a calcio y un dominio C-terminal globular (Martínez-González, 2005). Por lo tanto, se trata de una proteína multifuncional que actúa como facilitador molecular, ya que a través de sus diferentes dominios se une a receptores celulares tipo integrina " $\alpha_v\beta_3$ " y no integrina "CD36", a componentes de la membrana extracelular, así como a otras proteínas, incluyendo el fibrinógeno, la fibronectina, las proteasas extracelulares y los factores de crecimiento (Lawler et al., 1998; Adams, 2001).

La TSP-1, es un inhibidor natural de la angiogénesis, bloquea todas las funciones de células endoteliales activadas y atenúa el crecimiento tumoral y la metástasis,

mientras que su ausencia puede favorecer el incremento de estos. La expresión de TSP-1 se relaciona inversamente con la progresión maligna en melanomas, y carcinoma de mama. La proteína THSD7B, aunque su función biológica no se conoce del todo, parece ser que en ratón se ha detectado como un gen candidato en la supresión de la metástasis (Gobeil et al., 2008). Además la THSD7B demostró una fuerte asociación con cáncer de páncreas en la población japonesa (Low et al., 2010). También en humano ha sido uno de los loci (lugar que ocupa un gen dentro de un cromosoma) identificado que se ha asociado con alcohólicos (Wang et al., 2011).

En nuestro trabajo la trombospondina de tipo 1 con dominio proteico 7B (17 kDa, PI= 8'01) tuvo una mayor expresión en el macho Ojeado en comparación con el Alegre. No obstante, no hemos encontrado ningún estudio en la bibliografía que correlacione esta proteína con los espermatozoides, aunque probablemente su incremento en PS no afectaría a los espermatozoides, sino que les beneficiaría ya que es una proteína muy rica en cisteína (antioxidante) (Lawler et al., 1978). Sin embargo, un estudio realizado por (Lawler et al., 1998) evidenció que los ratones con deficiencia en la proteína TSP-1 son viables y fértiles. Eso nos hace pensar que esta proteína en sí no es imprescindible en la fecundación. Tampoco hemos encontrado referencia alguna que demostrase la expresión de esta proteína en el testículo o en algún órgano del tracto genital masculino. En cambio, se ha detectado la expresión en el testículo de otros miembros de su familia, como son la TSP-2 y TSP-3 (Adolph, 1999). TSP-5 sí se ha detectado (Gobeil et al., 2008), por tanto los órganos que tienen mayor expresión de esta proteína son los que más sufren su deficiencia, por ejemplo, durante un proceso inflamatorio en pulmón su deficiencia hace con que se agrave la situación, porque en este órgano se suele sobreexpresar.

Por otro lado, en varios trabajos se demostró que la TSP-1 es una proteína de alto peso molecular aunque en este trabajo hemos obtenido una TSP-1 de bajo peso molecular (17 kDa). Este resultado es coherente con estudios realizado por (Lawler et al., 1978) donde presenciaron una cantidad variable de la trombospondina de bajo peso molecular 38 kDa, 27 kDa, 20 kDa y 12 kDa.

## Conclusiones

1. Los espermatozoides obtenidos de epidídimo de caballo conservados a 4°C durante 0, 24, 48, 72 y 96 horas mantienen su capacidad fecundante tras la congelación-descongelación.
2. La obtención retrógrada de espermatozoides de la cola de epidídimo nos puede garantizar la preservación de un número de espermatozoides funcionales que pueden ser utilizados con éxito en técnicas de reproducción asistida (FIV e ICSI).
3. La viabilidad espermática se mantiene entre los grupos (0, 24, 48, 72 y 96 horas) sin diferencias hasta las 72 horas de la conservación de los epidídimos a 4°C.
4. El plasma seminal del macho con la mayor capacidad antioxidante, la mayor concentración proteica y la mayor concentración de ácidos grasos polinsaturados (omega-3 y omega-6), es el que mejor protege la viabilidad espermática durante el proceso de la congelación.
5. Las proteínas ricas en cisteínas 3 (CRISP-3) y las proteínas de plasma seminal de caballo 1 (HSP-1) tuvieron mayor significación en el PS de Faraón.
6. Las proteínas: receptor de la inmunoglobulina polimérica (pIgR), precursor de la albúmina sérica, calicreína y proteína 5 asociada a la remodelación de la matriz (MXRA5) tuvieron mayor significación en el PS de Alegre.
7. La proteína trombospondina tipo 1 tuvo mayor significación en el PS de Ojeado y Faraón.

Como conclusión general podemos decir que los espermatozoides almacenados en epidídimo conservados a 4°C hasta 96 h pueden ser criconservados sin perder su capacidad fecundante. Por tanto éste podría ser un método válido para preservar la genética de animales de alto valor.

## Conclusions

1. Equine spermatozoa stored in the epididymis for up to 96 h at 4°C can be successfully cryopreserved and maintain their fertilization capacity after thawing.
2. The retrograde flushing by air followed by cryopreservation ensure the preservation of a number of functional sperm which can be used to successfully fertilize heterologous oocytes using techniques such as IVF and ICSI.
3. The sperm vitality is kept in epididymis (0, 24, 48, 72 and 96 hours) at 4°C without differences up to 72 hours of storage.
4. The seminal plasma of the equine with the highest antioxidant capacity, the highest protein concentration and with the highest concentration of polyunsaturated fatty acids (omega-3 and omega-6) protects better the sperms during freezing.
5. The cystein-rich secretory protein 3 (CRISP-3) and proteins of seminal plasma horse 1 (HSP-1) had the greatest significance in seminal plasma of Faraón.
6. The proteins: the polymeric immunoglobulin receptor, the serum albumin precursor, the kallikrein and the matrix-remodeling-associated protein 5 had greater significance in the seminal plasma of Alegre.
7. The protein thrombospondin type-1 domain-containing protein 7B had greater significance in the seminal plasma of Ojeado and Faraón.

As general conclusion the storage of stallion sperm into epididymis at 4°C for up to 96 h could be an efficient system to preserve gametes from genetically important animals.

**Abreviaturas**

**2D-DIGE: Electroforesis en gel diferencial de dos dimensiones** "two-dimensional differential in-gel electrophoresis"

**2D-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida de dos dimensiones** "Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis"

**A:** Alegre

**ABTS:** (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzotiazoline-6-sulphonic acid)

**AC:** Antes de Cristo

**ACs:** Adenil ciclasa soluble

**ADN:** Ácido desoxiribonucleico

**ADP:** Adenosina difosfato "**A**denosine **Di**Phosphate"

**AMPc:** Adenosina monofosfato cíclico

**AQN-1:** Alanina-glutamina-aspargina

**ARN:** Ácido ribonucleico

**AST:** Aspartato aminotransferasa

**ATP:** Adenosina trifosfato "**A**denosine **Tri**Phosphate"

**AWN:** Alanina-triptófano-aspargina

**BC:** Células basales "cells basal"

**BG:**  $\beta$ -glucuronidasa

**BHT:** Butilhidritolueno

**BSA:** Albúmina sérica bovino "Bovine serum albumine"

**CA:** Anhidrasa carbónica

**CAT:** Catalasa

**CFD:** Diacetato de carboxifluoresceína

**CL:** Cardiolipina

**CRISP-3:** Proteínas secretoras ricas en cisteína "Cysteine-rich secretory protein 3"

**DCF:** Diclorofluoresceína

**DMF:** dimetilformamida

**DTT:** Ditioneitol

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético disódico "Disodium ethylenediaminetetraacetic acid"

**F:** Faraón

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína

**FIV:** Fecundación in Vitro

**Fn-2:** Fibronectina tipo II

**FRAP:** Recuperación de fluorescencia después de fotodecoloración "Fluorescence recovery after photobleaching"

**GPx:** Glutación peroxidasa "glutathione peroxidase"

**GSH:** Glutación reductasa

**HCG:** Gonadotropina coriónica humana "Human Chorionic Gonadotrophin"

**HSP:** Proteínas de plasma seminal de caballo "horse seminal protein"

**ICSI:** Inyección intracitoplasmática de espermatozoides "Intracytoplasmic sperm injection"

**IgA:** Inmunoglobulina A

**IgM:** Inmunoglobulina M

**INRA-96:** Instituto nacional de investigación de agronomía "Institut National de la Recherche Agronomique"

**IP:** Ioduro de propidio

**IP<sub>3</sub>:** Inositol trifosfato "inositol trisphosphate"

**IUCN:** Unión Internacional para la Conservación de Recursos y la Naturaleza "International Union for Conservation of Nature and Natural Resources"

**LDL:** lipoproteína de baja densidad "Lipoprotein density low"

**LPO:** lipoperoxidación lipídica "lipoperoxidation"

**MF:** metilformamida

**MIF:** El factor inhibidor de la migración de macrófago "migration inhibitory factor Macrophage"

**MP:** Motilidad progresiva

**MUFA:** Ácidos grasos monoinsaturados "monounsaturated fatty acid"

**MXRA5:** Proteína 5 asociada a la remodelación de la matriz "Matrix-remodeling-associated protein 5"

**O:** Ojeado

**PBS:** Tampón fosfato salino de Dulbecco modificado "Phosphate Buffer Saline"

**pIgR:** Receptor de inmunoglobulina polimérica "polymeric immunoglobulin receptor"

**PLC<sub>z</sub>:** Fosfolipasa C

**PM:** Peso molecular

**PMCG:** Gonadotropina sérica de yegua gestante "Pregnant Mare Serum Gonadotrophin"

**PNA:** Lectina Arachis Hipogaea "Peanut Agglutinin"

**PS:** Plasma semina

**PUFA:** Ácidos grasos poli-insaturados "polyunsaturated fatty acids"

**PVA:** Alcohol de polivinilo

**RA:** Reacción acrosómica

**ROO:** peróxido

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno "Reactive Oxygen Species"

**SDS:** dodecilsulfato sódico "sodium dodecyl sulfate"

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico "sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis"

**SFA:** Ácidos grasos saturados "saturated fatty acids"

**SFB:** Suero fetal bovino

**SGG:** Sulfogalactosilglicerolípido

**SOD:** Superóxido dismutasa "superoxide dismutase"

**SSF:** Solución salina fisiológica

**TA:** Temperatura ambiente

**TAC:** Capacidad antioxidante total "antioxidant capacity"

**THSD7B:** trombospondina de tipo 1 con dominio proteico 7B "Thrombospondin type-1 domain-containing protein 7B"

**TSP-1:** trombospondina de tipo 1

**U:** Udón

**ZP:** Zona pelúcida

Referencias Bibliográficas

Adam, S., Polo, S.E., 2012. Chromatin Dynamics during Nucleotide Excision Repair: Histones on the Move. *Int J Mol Sci* 13, 11895-11911.

Adams, G.P., Ratto, M.H., Collins, C.W., Bergfelt, D.R., 2009. Artificial insemination in South American camelids and wild equids. *Theriogenology* 71, 166-175.

Adams, J.C., 2001. Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 25-51.

Adolph, K.W., 1999. Relative abundance of thrombospondin 2 and thrombospondin 3 mRNAs in human tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 258, 792-796.

Ahluwalia, B., Holman, R.T., 1969. Fatty acid composition of lipids of bull, boar, rabbit and human semen. *J. Reprod. Fertil.* 18, 431-437.

Aitken, R.J., Baker, M.A., 2004. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod. Fertil. Dev.* 16, 581-588.

Aitken, R.J., Wingate, J.K., De Iulii, G.N., Koppers, A.J., McLaughlin, E.A., 2006. Cis-unsaturated fatty acids stimulate reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in human spermatozoa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 4154-4163.

Aksoy, Y., Aksoy, H., Altinkaynak, K., Aydin, H.R., Ozkan, A., 2006. Sperm fatty acid composition in subfertile men. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 75, 75-79.

Alberts B, B.D.L.J., 1994. *Membrane Structure in Molecular Biology of the Cell* Garland Publishing, New York.

Alvarez, J.G., Lasso, J.L., Blasco, L., Nunez, R.C., Heyner, S., Caballero, P.P., Storey, B.T., 1993. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. *Hum. Reprod.* 8, 1087-1092.

Alvarez, J.G., Storey, B.T., 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res* 23, 77-90.

Alvarez Sedó, C., Oko, R., Sutovsky, P., Chemes, H., Rawe, V.Y., 2009. Biogenesis of the sperm head perinuclear theca during human spermiogenesis. *Fertil. Steril.* 92, 1472-1473.

Amann, R.P., Cristanelli, M.J., Squires, E.L., 1987. Proteins in stallion seminal plasma. *J Reprod Fertil Suppl* 35, 113-120.

Apweiler, R., Hermjakob, H., Sharon, N., 1999. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1473, 4-8.

Asa, C.S., Moehlman, P.D., 2002. *Equid reproductive biology. Equids: zebras, asses and*

horses, 113-117.

Asadpour, R., Alavi-Shoushtari, S.M., Rezaii, S.A., Ansari, M.H., 2007. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Anim. Reprod. Sci.* 102, 308-313.

Aumüller, G., Renneberg, H., Schiemann, P.J., Wilhelm, B., Seitz, J., Konrad, L., Wennemuth, G., 1997. The role of apocrine released proteins in the post-testicular regulation of human sperm function. *Adv Exp Med Biol* 424, 193-219.

Aurich, J., Aurich, C., 2006. Developments in European horse breeding and consequences for veterinarians in equine reproduction. *Reprod. Domes. Anim.* 41, 275-279.

Aurich, J.E., Kuhne, A., Hoppe, H., Aurich, C., 1996. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology* 46, 791-797.

Aveldano, M.I., Rotstein, N.P., Vermouth, N.T., 1992. Lipid remodelling during epididymal maturation of rat spermatozoa. Enrichment in plasmenylcholines containing long-chain polyenoic fatty acids of the n-9 series. *Biochem. J.* 283 ( Pt 1), 235-241.

Awano, M., Kawaguchi, A., Mohri, H., 1993. Lipid composition of hamster epididymal spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility* 99, 375-383.

Bailey, J.L., Bilodeau, J.F., Cormier, N., 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.* 21, 1-7.

Balhorn, R., Brewer, L., Corzett, M., 2000. DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: Analysis of toroid stability using single DNA molecules. *Mol. Reprod. Dev.* 56, 230-234.

Balhorn, R., Weston, S., Thomas, C., Wyrobek, A.J., 1984. DNA packaging in mouse spermatids: synthesis of protamine variants and four transition proteins. *Experimental cell research* 150, 298-308.

Ball, B.A., 2008. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 257-267.

Ball, B.A., Fagnan, M.S., Dobrinski, I., 1997. Determination of acrosin amidase activity in equine spermatozoa. *Theriogenology* 48, 1191-1198.

Ball, B.A., Vo, A., 2001. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *J. Androl.* 22, 1061-1069.

Ball, B.A., Vo, A.T., Baumber, J., 2001. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *American journal of veterinary research* 62, 508-515.

Barbonetti, A., Vassallo, M.R., Cordeschi, G., Venetis, D., Carboni, A., Sperandio, A., Felzani, G., Francavilla, S., Francavilla, F., 2010. Protein tyrosine phosphorylation of the human sperm head during capacitation: immunolocalization and relationship with acquisition of sperm-fertilizing ability. *Asian J Androl* 12, 853-861.

Barker, C.A., Gandier, J.C., 1957. Pregnancy In A Mare Resulting From Frozen Epididymal Spermatozoa. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 21, 47-51.

- Barrabés, S., Sarrats, A., Fort, E., De Llorens, R., Rudd, P.M., Peracaula, R., 2010. Effect of sialic acid content on glycoprotein pl analyzed by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 31, 2903-2912.
- Barrios, B., Fernández-Juan, M., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A., 2005. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *J. Androl.* 26, 539-549.
- Barrios, B., Perez-Pe, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muino-Blanco, T., Cebrian-Perez, J.A., 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol. Reprod.* 63, 1531-1537.
- Barth, A.D., Oko, R.J., 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press.
- Bartolomé, E., Cervantes, I., Gómez, M.D., Molina, A., Valera, M., 2008. Influencia de los factores ambientales en el rendimiento deportivo del caballo en pruebas objetivas de rendimiento funcional (Salto de Obstáculos), XIV Reunion Nacional de Mejora Genetica Animal, Sevilla.
- Baumber, J., Ball, B.A., Linfor, J.J., 2005. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *American Journal of Veterinary Research* 66, 772-779.
- Baumber, J., Ball, B.A., Linfor, J.J., Meyers, S.A., 2003. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J. Androl.* 24, 621-628.
- Baumber, J., Vo, A., Sabeur, K., Ball, B.A., 2002. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology* 57, 1025-1033.
- Belokopytova, I.A., Kostyleva, E.I., Tomilin, A.N., Vorob'ev, V.I., 2005. Human male infertility may be due to a decrease of the protamine P2 content in sperm chromatin. *Mol. Reprod. Dev.* 34, 53-57.
- Bennett, J.P., 1965. Quantitative comparisons of the proteins of the seminal plasmas of bull, ram, rabbit and boar by agar gel electrophoresis. *Journal of reproduction and fertility* 9, 217-231.
- Bennett, J.P., Rowson, L.E., 1963. A Fistula for the Collection of Epididymal Semen from the Bull. *J. Reprod. Fertil.* 6, 61-64.
- Benoff, S., 1997. Carbohydrates and fertilization: an overview. *Mol Hum Reprod* 3, 599-637.
- Bergeron, A., Brindle, Y., Blondin, P., Manjunath, P., 2007. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biol. Reprod.* 77, 120-126.
- Berndtson, W.E., Pickett, B.W., Nett, T.M., 1974. Reproductive physiology of the stallion. IV. Seasonal changes in the testosterone concentration of peripheral plasma. *J. Reprod. Fertil.* 39, 115-118.
- Bilinska, B., Hejmej, A., Gancarczyk, M., Sadowska, J., 2005. Immunoexpression of androgen receptors in the reproductive tract of the stallion. *Annals of the New York*

Academy of Sciences 1040, 227-229.

Bilodeau, J.F., Chatterjee, S., Sirard, M.A., Gagnon, C., 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev* 55, 282-288.

Bjorndahl, L., Kvist, U., 2010. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Mol Hum Reprod* 16, 23-29.

Blash, S., Melican, D., Gavin, W., 2000. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology* 54, 899-905.

Bleau, G., VandenHeuvel, W.J.A., 1974. Desmosteryl sulfate and desmosterol in hamster epididymal spermatozoa. *Steroids* 24, 549-556.

Blesbois, E., Grasseau, I., Seigneurin, F., 2005. Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. *Reproduction* 129, 371-378.

Blottner, S., Warnke, C., Tuchscherer, A., Heinen, V., Torner, H., 2001. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Anim. Reprod. Sci.* 65, 75-88.

Bogle, O.A., Ratto, M.H., Adams, G.P., 2011. Evidence for the conservation of biological activity of ovulation-inducing factor in seminal plasma. *Reproduction* 142, 277-283.

Boisvert, M., Bergeron, A., Lazure, C., Manjunath, P., 2004. Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. *Biol. Reprod.* 70, 656-661.

Bookstein, C., Musch, M.W., Dudeja, P.K., McSwine, R.L., Xie, Y., Brasitus, T.A., Rao, M.C., Chang, E.B., 1997. Inverse relationship between membrane lipid fluidity and activity of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers, NHE1 and NHE3, in transfected fibroblasts. *J. Membr. Biol.* 160, 183-192.

Brandon, C.I., Heusner, G.L., Caudle, A.B., Fayrer-Hosken, R.A., 1999. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology* 52, 863-873.

Braun, J., Sakai, M., Hochi, S., Oguri, N., 1994. Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. *Theriogenology* 41, 809-818.

Brewer, L., Corzett, M., Balhorn, R., 2002. Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *Journal of Biological Chemistry* 277, 38895-38900.

Brewer, L., Corzett, M., Lau, E.Y., Balhorn, R., 2003. Dynamics of protamine 1 binding to single DNA molecules. *Journal of Biological Chemistry* 278, 42403-42408.

Brinsko, S.P., Crockett, E.C., Squires, E.L., 2000. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology* 54, 129-136.

Brinsko, S.P., Love, C.C., Bauer, J.E., Macpherson, M.L., Varner, D.D., 2007. Cholesterol-to-phospholipid ratio in whole sperm and seminal plasma from fertile stallions and stallions with unexplained subfertility. *Anim. Reprod. Sci.* 99, 65-71.

Brito, L.F.C., 2007. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice* 6, 249-264.

- Brown, W.J., Chambers, K., Doody, A., 2003. Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. *Traffic* 4, 214-221.
- Bruemmer, J., Reger, H., Zibinski, G., Squires, E., 2002. Effect of storage at 5 C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 58, 405-407.
- Bruemmer, J.E., 2006. Collection and freezing of epididymal stallion sperm. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 22, 677-682.
- Buckanovich, R.J., Sasaroli, D., O'Brien-Jenkins, A., Botbyl, J., Hammond, R., Katsaros, D., Sandaltzopoulos, R., Liotta, L.A., Gimotty, P.A., Coukos, G., 2007. Tumor vascular proteins as biomarkers in ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* 25, 852-861.
- Buckett, W.M., Luckas, M.J., Gazvani, M.R., Aird, I.A., Lewis-Jones, D.I., 1997. Seminal plasma lactoferrin concentrations in normal and abnormal semen samples. *J. Androl.* 18, 302-304.
- Calvete, J.J., Mann, K., Schäfer, W., Sanz, L., Reinert, M., Nessau, S., Raida, M., Töpfer-Petersen, E., 1995. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *Biochem. J.* 310, 615.
- Calvete, J.J., Nessau, S., Mann, K., Sanz, L., Sieme, H., Klug, E., Töpfer-Petersen, E., 1994. Isolation and Biochemical Characterization of Stallion Seminal plasma Proteins. *Reprod. Domest. Anim.* 29, 411-426.
- Calvete, J.J., Raida, M., Gentzel, M., Urbanke, C., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E., 1997. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Letters* 407, 201-206.
- Cameo, M.S., Blaquier, J.A., 1976. Androgen-controlled specific proteins in rat epididymis. *J. Endocrinol.* 69, 47-55.
- Campos, V.A.L., McManus, C., Fuck, B.H., Cassiano, L., Pinto, B.F., Braga, A., Louvandini, H., Dias, L.T., Teixeira, R.A., 2007. Influência de fatores genéticos e ambientais sobre as características produtivas no rebanho equino do Exército Brasileiro. *Revista Brasileira de Zootecnia* 36, 23-31.
- Card, C.E., Manning, S.T., Bowman, P., Leibel, T., 1997. Pregnancies from imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation in a disabled stallion. *The Canadian Veterinary Journal* 38, 171.
- Cardozo, J.A., Fernández-Juan, M., Forcada, F., Abecia, A., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A., 2006. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology* 66, 841-850.
- Carvalho, A.L., Sanz, L., Baretino, D., Romero, A., Calvete, J.J., Romão, M.J., 2002. Crystal structure of a prostate kallikrein isolated from stallion seminal plasma: a homologue of human PSA. *J. Mol. Biol.* 322, 325-337.
- Cary, J.A., Madill, S., Farnsworth, K., Hayna, J.T., Duoos, L., Fahning, M.L., 2004. A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. *Can Vet J* 45, 35-41.
- Casas, I., Sancho, S., Briz, M., Pinart, E., Bussalleu, E., Yeste, M., Bonet, S., 2009.

Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. *Theriogenology* 72, 930-948.

Casey, P.J., Gravance, C.G., Davis, R.O., Chabot, D.D., Liu, I.K., 1997. Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. *Theriogenology* 47, 575-582.

Clulow, J.R., Evans, G., Maxwell, W.M., Morris, L.H., 2010. Evaluation of the function of fresh and frozen-thawed sex-sorted and non-sorted stallion spermatozoa using a heterologous oocyte binding assay. *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 710-717.

Cochran, J.D., Amann, R.P., Froman, D.P., Pickett, B.W., 1984. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5 C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology* 22, 25-38.

Comizzoli, P., Mermillod, P., Cognie, Y., Chai, N., Legendre, X., Mauget, R., 2001. Successful in vitro production of embryos in the red deer (*Cervuselaphus*) and the sika deer (*Cervusnippon*). *Theriogenology* 55, 649-659.

Conquer, J., Martin, J., Tummon, I., Watson, L., Tekpetey, F., 1999. Fatty acid analysis of blood serum, seminal plasma, and spermatozoa of normozoospermic vs. Asthernozoospermic males. *Lipids* 34, 793-799.

Cooper, T.G., 1998. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* 53, 119-136.

Córdova, A., Pérez-Gutiérrez, J.F., Lleó, B., García-Artiga, C., Alvarez, A., Drobchak, V., Martín-Rillo, S., 2002. In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws. *Theriogenology* 57, 2119-2128.

Córdova, A., Pérez, J.F., Lleó, B., Artiga, C.G., Rillo, S.M., 2001. In vitro Fertilizing Capacity of Deep Frozen Boar Semen Packaged in 0.5 and 5 ml Straws. *Reprod. Domest. Anim.* 36, 199-202.

Cornwall, G.A., 2009. New insights into epididymal biology and function. *Human reproduction update* 15, 213-227.

Correa, L.M., Thomas, A., Meyers, S.A., 2007. The macaque sperm actin cytoskeleton reorganizes in response to osmotic stress and contributes to morphological defects and decreased motility. *Biol. Reprod.* 77, 942-953.

Coy, P., Grullon, L., Canovas, S., Romar, R., Matas, C., Aviles, M., 2008. Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. *Reproduction* 135, 19-27.

Crichton, E.G., Hinton, B.T., Pallone, T.L., Hammerstedt, R.H., 1994. Hyperosmolality and sperm storage in hibernating bats: prolongation of sperm life by dehydration. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 267, R1363-R1370.

Cheng, F.P., Fazeli, A., Voorhout, W.F., Marks, A., Bevers, M.M., Colenbrander, B., 1996. Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *J. Androl.* 17, 674.

Choi, Y., Love, C., Love, L., Varner, D., Brinsko, S., Hinrichs, K., 2002. Developmental competence in vivo and in vitro of in vitro-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa.

Reproduction 123, 455.

Choi, Y.H., Landim-Alvarenga, F.C., Seidel, G.E., Jr., Squires, E.L., 2003. Effect of capacitation of stallion sperm with polyvinylalcohol or bovine serum albumin on penetration of bovine zona-free or partially zona-removed equine oocytes. *J Anim Sci* 81, 2080-2087.

Christie, W.W., Han, X., 2010. *Lipid analysis: Isolation, separation, identification and lipidomic analysis*. Oily Press Bridgewater, UK.

D'Occhio, M.J., Hengstberger, K.J., Johnston, S.D., 2007. Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. *Anim. Reprod. Sci.* 101, 1-17.

Dacheux, J.L., Gatti, J.L., Dacheux, F., 2003. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc. Res. Tech.* 61, 7-17.

Dadoune, J.P., 2003. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc. Res. Tech.* 61, 56-75.

Darin-Bennett, A., White, I.G., 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 14, 466-470.

Dawson, R.M.C., Mann, T., White, I.G., 1957. Glycerylphosphorylcholine and phosphorylcholine in semen, and their relation to choline. *Biochem. J.* 65, 627.

de Andrade, A.F.C., Zaffalon, F.G., Celeghini, E.C.C., Nascimento, J., Bressan, F.F., Martins, S.M.M.K., de Arruda, R.P., 2012. Post-thaw addition of seminal plasma reduces tyrosine phosphorylation on the surface of cryopreserved equine sperm, but does not reduce lipid peroxidation. *Theriogenology* 77, 1866-1872.e1863.

de Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., Gagnon, C., 1997a. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 2, 48-54.

de Lamirande, E., Leclerc, P., Gagnon, C., 1997b. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* 3, 175 - 194.

de Lamirande, E., O'Flaherty, C., 2008. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim Biophys Acta* 1784, 106-115.

DeMott, R.P., Lefebvre, R., Suarez, S.S., 1995. Carbohydrates mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium. *Biol. Reprod.* 52, 1395-1403.

Deraga, D., 2007. El caballo y el deporte. *Estudios del hombre*, 193-209.

Desantis, S., Ventriglia, G., Zizza, S., Nicassio, M., Valentini, L., Di Summa, A., Lacalandra, G.M., 2010. Lectin-binding sites on ejaculated stallion sperm during breeding and non-breeding periods. *Theriogenology* 73, 1146-1153.

Dias, G.M., Retamal, C.A., Tobella, L., Arnholdt, A.C., Lopez, M.L., 2006. Nuclear status of immature and mature stallion spermatozoa. *Theriogenology* 66, 354-365.

Dormeyer, W., van Hoof, D., Mummery, C.L., Krijgsveld, J., Heck, A.J.R., 2008. A practical guide for the identification of membrane and plasma membrane proteins in human embryonic stem cells and human embryonal carcinoma cells. *Proteomics* 8, 4036-4053.

- Doty, A., Buhi, W.C., Benson, S., Scoggin, K.E., Pozor, M., Macpherson, M., Mutz, M., Troedsson, M.H.T., 2011. Equine CRISP3 modulates interaction between spermatozoa and polymorphonuclear neutrophils. *Biol. Reprod.* 85, 157-164.
- Edwards, J.L., Hansen, P.J., 1996. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. *Biol. Reprod.* 55, 341-346.
- Ekhlas-Hundrieser, M., Schäfer, B., Kirchhoff, C., Hess, O., Bellair, S., Müller, P., Töpfer-Petersen, E., 2005. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. *Mol. Reprod. Dev.* 70, 45-57.
- Elzanaty, S., Erenpreiss, J., Becker, C., 2007. Seminal plasma albumin: origin and relation to the male reproductive parameters. *Andrologia* 39, 60-65.
- Ellerman, D.A., Da Ros, V.G., Cohen, D.J., Busso, D., Morgenfeld, M.M., Cuasnicú, P.S., 2002. Expression and structure-function analysis of de, a sperm cysteine-rich secretory protein that mediates gamete fusion. *Biol. Reprod.* 67, 1225-1231.
- Endenburg, N., 1999. Perceptions and attitudes towards horses in European societies. *Equine Veterinary Journal* 31, 38-41.
- England, G.C.W., Ponzio, P., 1996. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology* 46, 165-171.
- Escalier, D., 1984. The cytoplasmic matrix of the human spermatozoon: cross-filaments link the various cell components. *Biol. Cell.* 51, 347-363.
- Evenson, D.P., Thompson, L., Jost, L., 1994. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology* 41, 637-651.
- Farstad, W., 2000. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 375-387.
- Ferraz, M.S., de Menezes, D.J., Pessoa, G.T., Cabral, R.M., Illera, M.J., Silva, A.R., Carvalho, M.A., 2011. Collection and evaluation of epididymal sperm in captive agoutis (*Dasyprocta aguti*). *Theriogenology* 75, 459-462.
- Fioratti, E.G., Melo, C.M., Villaverde, A.I.S.B., Martin, I., Felício, G.B., Ferreira, H.N., Oliveira, J.V., Alvarenga, M.A., Papa, F.O., 2008. Correlation of testicular volume and weight with sperm recovery from stallion epididymis. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 322.
- Flesch, F.M., Gadella, B.M., 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews On Biomembranes* 1469, 197-235.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226, 497-509.
- Ford, W.C., 2004. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update* 10, 387-399.
- Fouchecourt, S., Metayer, S., Locatelli, A., Dacheux, F., Dacheux, J.L., 2000. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol. Reprod.* 62, 1790-1803.

- França, L.R., Avelar, G.F., Almeida, F.F.L., 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* 63, 300-318.
- Fraser, L.R., Adeoya-Osiguwa, S., Baxendale, R.W., Mededovic, S., Osiyuwa, O.O., 2005. First messenger regulation of mammalian sperm function via adenylyl cyclase/cAMP. *Journal Of Reproduction And Development* 51, 37-46.
- Frazer, G.S., Bucci, D.M., 1996a. Characterization of the major polypeptides of equine seminal plasma by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology* 46, 1389-1402.
- Frazer, G.S., Bucci, D.M., 1996b. SDS-PAGE Characterization of the proteins in equine seminal plasma. *Theriogenology* 46, 579-591.
- Free, M.J., Schluntz, G.A., Jaffe, R.A., 1976. Respiratory gas tensions in tissues and fluids of the male rat reproductive tract. *Biol. Reprod.* 14, 481-488.
- Furimsky, A., Vuong, N., Xu, H., Kumarathasan, P., Xu, M., Weerachatyanukul, W., Bou Khalil, M., Kates, M., Tanphaichitr, N., 2005. Percoll gradient-centrifuged capacitated mouse sperm have increased fertilizing ability and higher contents of sulfogalactosylglycerolipid and docosahexaenoic acid-containing phosphatidylcholine compared to washed capacitated mouse sperm. *Biol. Reprod.* 72, 574-583.
- Gadea, J., 2005. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology* 63, 431-444.
- Gadea, J., Gumbao, D., Canovas, S., Garcia-Vazquez, F.A., Grullon, L.A., Gardon, J.C., 2008. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. *Int J Androl* 31, 40-49.
- Gadea, J., Gumbao, D., Matas, C., Romar, R., 2005. Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. *J. Androl.* 26, 749-756.
- Gadea, J., Molla, M., Selles, E., Marco, M.A., Garcia-Vazquez, F.A., Gardon, J.C., 2011. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology* 62, 40-46.
- Gadea, J., Selles, E., Marco, M.A., Coy, P., Matas, C., Romar, R., Ruiz, S., 2004. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology* 62, 690-701.
- Gadella, B., Colenbrander, B., Lopes-Cardozo, M., 1991. Arylsulfatases are present in seminal plasma of several domestic mammals. *Biol. Reprod.* 45, 381-386.
- Gadella, B., Rathi, R., Brouwers, J., Stout, T., Colenbrander, B., 2001. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 249-265.
- Gadella, B.M., Colenbrander, B., Van Golde, L.M., Lopes-Cardozo, M., 1993. Boar seminal vesicles secrete arylsulfatases into seminal plasma: evidence that desulfation of seminolipid occurs only after ejaculation. *Biol. Reprod.* 48, 483-489.
- Gamboa, S., Ramalho-Santos, J., 2005. SNARE proteins and caveolin-1 in stallion spermatozoa: possible implications for fertility. *Theriogenology* 64, 275-291.

- Gañán, N., Sestelo, A., Garde, J.J., Martínez, F., Vargas, A., Sánchez, I., Pérez-Aspa, M.J., López-Bao, J.V., Palomares, F., Gomendio, M., Roldan, E.R., 2010. Reproductive traits in captive and free-ranging males of the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Reproduction* 139, 275-285.
- García-Alvarez, O., Maroto-Morales, A., Martínez-Pastor, F., Fernández-Santos, M.R., Estes, M.C., Pérez-Guzmán, M.D., Soler, A.J., 2009. Heterologous in vitro fertilization is a good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology* 71, 643-650.
- García-Vázquez, F.A., Ruiz, S., Matas, C., Izquierdo-Rico, M.J., Grullon, L.A., De Ondiz, A., Vieira, L., Aviles-Lopez, K., Gutierrez-Adan, A., Gadea, J., 2010. Production of transgenic piglets using ICSI-sperm-mediated gene transfer in combination with recombinase RecA. *Reproduction* 140, 259-272.
- García, B.M., Moran, A.M., Fernández, L.G., Ferrusola, C.O., Rodríguez, A.M., Bolanos, J.M.G., da Silva, C.M.B., Martínez, H.R., Tapia, J.A., Pena, F.J., 2012. The mitochondria of stallion spermatozoa are more sensitive than the plasmalemma to osmotic-induced stress: role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. *J. Androl.* 33, 105.
- Garde, J., Aguado, M., Pérez, S., Garrido, D., Pérez-Guzmán, M., Montoro, V., 1994. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem rams. *Theriogenology* 41, 203.
- Gatti, J.L., Druart, X., Syntin, P., Gúerin, Y., Dacheux, J.L., Dacheux, F., 2000. Biochemical characterization of two ram cauda epididymal maturation-dependent sperm glycoproteins. *Biol. Reprod.* 62, 950-958.
- Gebauer, M.R., Pickett, B.W., Swierstra, E.E., 1974a. Reproductive physiology of the stallion. II. Daily production and output of sperm. *J Anim Sci* 39, 732-736.
- Gebauer, M.R., Pickett, B.W., Swierstra, E.E., 1974b. Reproductive Physiology of the Stallion. III. Extra-Gonadal Transit Time and Sperm Reserves. *Journal Of Animal Science* 39, 737-742.
- Gilmore, D.P., Hooker, R.H., Chang, M.C., 1971. A technique for the collection by fistula of epididymal spermatozoa from the rat. *J. Reprod. Fertil.* 25, 137-140.
- Glazar, A.I., Mullen, S.F., Liu, J., Benson, J.D., Critser, J.K., Squires, E.L., Graham, J.K., 2009. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology* 59, 201-206.
- Gloria, A., Contri, A., De Amicis, I., Robbe, D., Carluccio, A., 2011. Differences between epididymal and ejaculated sperm characteristics in donkey. *Anim. Reprod. Sci.* 128, 117-122.
- Gobeil, S., Zhu, X., Doillon, C.J., Green, M.R., 2008. A genome-wide shRNA screen identifies GAS1 as a novel melanoma metastasis suppressor gene. *Genes Dev.* 22, 2932-2940.
- Godke, R.A., James, A., Hebert, K., Denniston, R.S., Paccamonti, D., 2003. The potential use of epididymal sperm from bulls and stallions for assisted fertilisation, In: Squires, E., Wade, J.F. (Eds.), *Workshop on Transporting Gametes and Embryos*, Brewster, Massachusetts, USA, pp. 55-60.
- Götting, C., Kuhn, J., Brinkmann, T., Kleesiek, K., 2002. Xylosyltransferase activity in seminal plasma of infertile men. *Clinica Chimica Acta* 317, 199-202.

- Granemann, L., Weiss, R., Kozicki, L., Muradas, P., Treml, T., 2006. Total number of spermatozoa from stud-horses collected by means of artificial vagina and through feedback flow of the epididymis tail. *Archives of Veterinary Science* 11, 73-77.
- Grasa, P., Coward, K., Young, C., Parrington, J., 2008. The pattern of localization of the putative oocyte activation factor, phospholipase C $\zeta$ , in uncapacitated, capacitated, and ionophore-treated human spermatozoa. *Human Reproduction* 23, 2513-2522.
- Gravance, C.G., Liu, I.K., Davis, R.O., Hughes, J.P., Casey, P.J., 1996. Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 108, 41-46.
- Greube, A., Müller, K., Töpfer-Petersen, E., Herrmann, A., Müller, P., 2004. Interaction of fibronectin type II proteins with membranes: the stallion seminal plasma protein SP-1/2. *Biochemistry (Mosc.)*. 43, 464-472.
- Guerrero, C.A., 2006. Cryopreservation and intracytoplasmic sperm injection with bovine epididymal spermatozoa, Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in The Interdepartmental Program of Animal and Dairy Sciences by Carlos A. Guerrero BS, Louisiana State University.
- Gulaya, N.M., Margitich, V.M., Govseeva, N.M., Klimashevsky, V.M., Gorpynchenko, I., Boyko, M.I., 2001. Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. *Arch Androl* 46, 169-175.
- Gutierrez-Perez, O., Juarez-Mosqueda, M.L., Mota, D., Trujillo, M.E., 2011. The disruption in actin-perinuclear theca interactions are related with changes induced by cryopreservation observed on sperm chromatin nuclear decondensation of boar semen. *Cryobiology* 62, 32-39.
- Haase, B., Schlotterer, C., Hundrieser, M.E., Kuiper, H., Distl, O., Töpfer-Petersen, E., Leeb, T., 2005. Evolution of the spermadhesin gene family. *Gene* 352, 20-29.
- Hafez, E.S.E., Hafez, B. (Eds.), 2000. *Reproductive cycles*.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press Oxford.
- Hamada, A., Sharma, R., du Plessis, S.S., Willard, B., Yadav, S.P., Sabanegh, E., Agarwal, A., 2013. Two-dimensional differential in-gel electrophoresis-based proteomics of male gametes in relation to oxidative stress. *Fertil. Steril.*
- Hammadeh, M.E., Kuhnen, A., Amer, A.S., Rosenbaum, P., Schmidt, W., 2001. Comparison of sperm preparation methods: effect on chromatin and morphology recovery rates and their consequences on the clinical outcome after in vitro fertilization embryo transfer. *Int J Androl* 24, 360-368.
- Hammerstedt, R.H., Keith, A.D., Hay, S., Deluca, N., Amann, R.P., 1979. Changes in ram sperm membranes during epididymal transit. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 196, 7-12.
- Harrison, R.A.P., Vickers, S.E., 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Reproduction* 88, 343-352.
- Harshan, H.M., Singh, L.P., Arangasamy, A., Ansari, M.R., Kumar, S., 2006. Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and in vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 93, 124-133.

- Hartree, E.F., Mann, T., 1959. Plasmalogen in ram semen, and its role in sperm metabolism. *Biochem. J.* 71, 423.
- Heise, A., Kahn, W., Volkmann, D.H., Thompson, P.N., Gerber, D., 2010. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 118, 48-53.
- Hemeida, N.A., Sack, W.O., McEntee, K., 1978. Ductuli efferentes in the epididymis of boar, goat, ram, bull, and stallion. *American Journal of Veterinary Research* 39, 1892-1900.
- Henttu, P., Vihko, P., 1994. Prostate-specific antigen and human glandular kallikrein: two kallikreins of the human prostate. *Ann. Med.* 26, 157-164.
- Hernandez, M., Roca, J., Calvete, J.J., Sanz, L., Muino-Blanco, T., Cebrian-Perez, J.A., Vazquez, J.M., Martinez, E.A., 2007. Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. *J. Androl.* 28, 689.
- Herold, F.C., Aurich, J.E., Gerber, D., 2004. Epididymal sperm from the African buffalo (< i> Syncerus caffer</i>) can be frozen successfully with AndroMed< sup>®</sup> and with Triladyl™ but the addition of bovine seminal plasma is detrimental. *Theriogenology* 61, 715-724.
- Herr, S., Marshall, C., 1981. Brucellosis in free-living African buffalo (*Syncerus caffer*): a serological survey. *The Onderstepoort journal of veterinary research* 48, 133.
- Hess, R.A., 2003. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 52.
- Hewitt, D.A., Leahy, R., Sheldon, I.M., England, G.C., 2001. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 67, 101-111.
- Hidalgo, M., Rodriguez, I., Dorado, J., Sanz, J., Soler, C., 2005. Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. *Vet. Med–Czech* 50, 24-32.
- Hidalgo Ordóñez, C.O., Tamargo Miguel, C., Díez Monforte, C., 2005. Análisis del semen bovino. *Tecnología agroalimentaria: Boletín informativo del SERIDA*, 39-43.
- Hingst, O., Blottner, S., Franz, C., 1995. Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit as studied by aniline blue and acridine orange staining. *Andrologia* 27, 275-279.
- Hinrichs, K., 2010. In vitro production of equine embryos: state of the art. *Reprod. Domes. Anim.* 45 Suppl 2, 3-8.
- Hinton, B.T., Palladino, M.A., Rudolph, D., Lan, Z.J., Labus, J.C., 1996. 2 The Role of the Epididymis in the Protection of Spermatozoa. *Current topics in developmental biology* 33, 61-102.
- Hishinuma, M., Suzuki, K., Sekine, J., 2003. Recovery and cryopreservation of sika deer (< i> Cervus nippon</i>) spermatozoa from epididymides stored at 4° C. *Theriogenology* 59, 813-820.
- Holt, W.V., 1997. Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 9, 309.

- Holt, W.V., 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53, 47-58.
- Holt, W.V., Lloyd, R.E., 2009. Artificial insemination for the propagation of CANDES: the reality! *Theriogenology* 71, 228-235.
- Honda, A., Yamagata, K., Sugiura, S., Watanabe, K., Baba, T., 2002. A mouse serine protease TESP5 is selectively included into lipid rafts of sperm membrane presumably as a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. *Journal of Biological Chemistry* 277, 16976-16984.
- Hoshiya, H., Sinowitz, F., 1998. Immunohistochemical Localization of the Spermadhesin AWN-1 in the Equine Male Genital Tract. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 27, 351-353.
- Hughes, D.W., Woloshuk, J.M., Hanham, A.C., Workman, D.J., Snively, D.W., Lewis, P.E., Walker, T.E., 2005. West Virginia Equine Economic Impact Study. West Virginia University.
- Hunter, R.H.F., Rodriguez-Martinez, H., 2003. Capacitation of mammalian spermatozoa in vivo, with a specific focus on events in the Fallopian tubes. *Mol. Reprod. Dev.* 67, 243-250.
- Ito, J., Parrington, J., Fissore, R.A., 2011. PLC $\zeta$  and its role as a trigger of development in vertebrates. *Mol. Reprod. Dev.* 78, 846-853.
- Iusem, N.D., Pineiro, L., Blaquier, J.A., Belocopitow, E., 1989. Identification of a major secretory glycoprotein from rat epididymis: interaction with spermatozoa. *Biol. Reprod.* 40, 307-316.
- Jager, S., Wijchman, J., Kremer, J., 1983. In vitro swelling of the human sperm nucleus in the presence of sodium dodecyl sulphate. *Arch Androl* 10, 201-208.
- James, A., Green, H., Hoffman, S., Landry, A., Paccamonti, D., Godke, R., 2002. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4 C for 24, 48, 72 and 96 hours. *Theriogenology* 58, 401-404.
- James, A.N., 2004. Preservation of sperm harvested from the rat, caprine, equine and bovine epididymis, The Interdepartmental Program of Animal and Dairy Sciences, Texas A&M University.
- James, P.S., Wolfe, C.A., Mackie, A., Ladha, S., Prentice, A., Jones, R., 1999. Lipid dynamics in the plasma membrane of fresh and cryopreserved human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 14, 1827-1832.
- Jimenez, C., 1987. Effects of Equex STM and equilibration time on the pre-freeze and postthaw motility of equine epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 28, 773-782.
- Jobim, M.I.M., Oberst, E.R., Salbego, C.G., Souza, D.O., Wald, V.B., Tramontina, F., Mattos, R.C., 2004. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology* 61, 255-266.
- Jobim, M.I.M., Trein, C., Zirkler, H., Gregory, R.M., Sieme, H., Mattos, R.C., 2011. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology* 76, 765-771.
- Johnson, L., Neaves, W.B., 1981. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. *Biol. Reprod.* 24, 703-712.

- Johnson, M.H., Everitt, B.J., 1980. Essential reproduction. Blackwell Scientific Publications.
- Jones, R., 1998a. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 53, 73-84.
- Jones, R., 2004. Sperm survival versus degradation in the Mammalian epididymis: a hypothesis. *Biol. Reprod.* 71, 1405-1411.
- Jones, R.C., 1998b. Evolution of the vertebrate epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 53, 163-181.
- Jonsson, M., Linse, S., Frohm, B., Lundwall, A., Malm, J., 2005. Semenogelins I and II bind zinc and regulate the activity of prostate-specific antigen. *Biochem. J.* 387, 447-453.
- Kaabi, M., Carbajo, M., Rouissi, H., Anel, E., Alvarez, M., Boixo, J.C., García, C., Anel, L., 1999. Efecto de la conservación postmortem de epidídimos de morueco sobre la evolución de malformaciones en los espermatozoides antes y después de la congelación. *Producción Ovina y Caprina* 24, 187-191.
- Kaabi, M., Paz, P., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J.C., Rouissi, H., Herraiez, P., Anel, L., 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology* 60, 1249-1259.
- Kaetzel, C.S., 2005. The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol. Rev.* 206, 83-99.
- Kareskoski, A.M., del Alamo, M.M., Guvenc, K., Reilas, T., Calvete, J.J., Rodriguez-Martinez, H., Andersson, M., Katila, T., 2011. Protein composition of seminal plasma in fractionated stallion ejaculates. *Reprod. Domes. Anim.* 46, e79-84.
- Kareskoski, A.M., Reilas, T., Andersson, M., Katila, T., 2006. Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractionated stallion ejaculates after storage. *Reprod. Domes. Anim.* 41, 33-38.
- Kareskoski, M., Katila, T., 2008. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 249-256.
- Kashir, J., Heynen, A., Jones, C., Durrans, C., Craig, J., Gadea, J., Turner, K., Parrington, J., Coward, K., 2011. Effects of cryopreservation and density-gradient washing on phospholipase C zeta concentrations in human spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 23, 263-267.
- Kasinsky, H.E., Eirin-Lopez, J.M., Ausio, J., 2011. Protamines: structural complexity, evolution and chromatin patterning. *Protein Pept Lett* 18, 755-771.
- Katila, T., 2001. Sperm-uterine interactions: a review. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 267-272.
- Katkov, I.I., Katkova, N., Critser, J.K., Mazur, P., 1998. Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology* 37, 325-338.
- Kavak, A., Johannisson, A., Lundeheim, N., Rodriguez-Martinez, H., Aidnik, M., Einarsson, S., 2003. Evaluation of cryopreserved stallion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.* 76, 205-216.
- Khosrowbeygi, A., Zarghami, N., 2007. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of oxidative stress biomarkers in subfertile males.

Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 77, 117-121.

Killian, G.J., Chapman, D.A., Rogowski, L.A., 1993. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol. Reprod.* 49, 1202-1207.

Kirton, K.T., Desjardins, C., Hafs, H.D., 1967. Distribution of sperm in male rabbits after various ejaculation frequencies. *The Anatomical Record* 158, 287-292.

Komarek, R.J., Pickett, B.W., Gibson, E.W., Lanz, R.N., 1965. Composition of lipids in stallion semen. *J. Reprod. Fertil.* 10, 337-342.

Koshimoto, C., Gamliel, E., Mazur, P., 2000. Effect of osmolality and oxygen tension on the survival of mouse sperm frozen to various temperatures in various concentrations of glycerol and raffinose. *Cryobiology* 41, 204-231.

Ladha, S., 1998. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. *J. Membr. Biol.* 165, 1-10.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lamirande, E.V.E., Yoshida, K., Yoshiike, M., Iwamoto, T., Gagnon, C., 2001. Semenogelin, the main protein of semen coagulum, inhibits human sperm capacitation by interfering with the superoxide anion generated during this process. *J. Androl.* 22, 672-679.

Langlois, B., 1980. d'après les sommes gagnées dans les compétitions équestres françaises.

Lasso, J.L., Noiles, E.E., Alvarez, J.G., Storey, B.T., 1994. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *J. Androl.* 15, 255-265.

Lawler, J., Sunday, M., Thibert, V., Duquette, M., George, E.L., Rayburn, H., Hynes, R.O., 1998. Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *J. Clin. Invest.* 101, 982.

Lawler, J.W., Slayter, H.S., Coligan, J.E., 1978. Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets. *Journal of Biological Chemistry* 253, 8609-8616.

Leahy, T., Gadella, B.M., 2011. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction* 142, 759-778.

Lefebvre, R., Lo, M.C., Suarez, S.S., 1997. Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition. *Biol. Reprod.* 56, 1198-1204.

Légaré, C., Bérubé, B., Boué, F., Lefièvre, L., Morales, C.R., El-Alfy, M., Sullivan, R., 1999. Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidylinositol-anchored protein. *Mol Reprod Dev* 52, 225-233.

Lenzi, A., Gandini, L., Maresca, V., Rago, R., Sgrò, P., Dondero, F., Picardo, M., 2000. Fatty acid composition of spermatozoa and immature germ cells. *Mol. Hum. Reprod.* 6, 226-231.

Lenzi, A., Picardo, M., Gandini, L., Dondero, F., 1996. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Human reproduction update* 2, 246-256.

- Leßig, J., Gey, C., Süß, R., Schiller, J., Glander, H.J., Arnhold, J., 2004. Analysis of the lipid composition of human and boar spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry, thin layer chromatography and <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 137, 265-277.
- Liau, J., Hoang, S., Choi, M., Eroglu, C., Choi, M., Sun, G.-h., Percy, M., Wildman-Tobriner, B., Bliss, T., Guzman, R.G., 2008. Thrombospondins 1 and 2 are necessary for synaptic plasticity and functional recovery after stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 1722-1732.
- Lindholmer, C., Carlstrom, A., Eliasson, R., 1974. Occurrence and origin of proteins in human seminal plasma with special reference to albumin. *Andrologia* 6, 181-196.
- Lipovac, M.G.V., 2000. Antioxidative effect of melatonin on human spermatozoa. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 44, 23-27.
- Lone, F.A., Islam, R., Khan, M.Z., Sofi, K.A., 2011. Effect of transportation temperature on the quality of cauda epididymal spermatozoa of ram. *Anim. Reprod. Sci.* 123, 54-59.
- Loomis, P.R., 2001. The equine frozen semen industry. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 191-200.
- Loomis, P.R., Graham, J.K., 2008. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim. Reprod. Sci.* 105, 119-128.
- Love, C.C., Kenney, R.M., 1999. Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease in protamine disulfide bonding in the stallion. *Biol. Reprod.* 60, 615-620.
- Low, S.-K., Kuchiba, A., Zembutsu, H., Saito, A., Takahashi, A., Kubo, M., Daigo, Y., Kamatani, N., Chiku, S., Totsuka, H., 2010. Genome-wide association study of pancreatic cancer in Japanese population. *PLoS One* 5, e11824.
- Lozada, C., Levin, R.I., Huie, M., Hirschhorn, R., Naime, D., Whitlow, M., Recht, P.A., Golden, B., Cronstein, B.N., 1995. Identification of C1q as the heat-labile serum cofactor required for immune complexes to stimulate endothelial expression of the adhesion molecules E-selectin and intercellular and vascular cell adhesion molecules 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 8378-8382.
- Luton, F., Cardone, M.H., Zhang, M., Mostov, K.E., 1998. Role of tyrosine phosphorylation in ligand-induced regulation of transcytosis of the polymeric Ig receptor. *Mol. Biol. Cell* 9, 1787-1802.
- Lutwak-Mann, M.T.C., 1981. *Male Reproductive Function and Semen*, Springer, Berlin. *Andrology*.
- Lux, C., 2010. *El caballo. 213 preguntas y respuestas*. Editorial Hispano Europea, SA.
- Lymberopoulos, A.G., Khalifa, T.A.A., 2010. Sperm Chromatin Stability During In Vitro Manipulation of Beef Bull Semen. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 307-314.
- Macías García, B., González Fernández, L., Ortega Ferrusola, C., Salazar-Sandoval, C., Morillo Rodríguez, A., Rodríguez Martínez, H., Tapia, J.A., Morcuende, D., Peña, F.J., 2011. Membrane Lipids of the Stallion Spermatozoon in Relation to Sperm Quality and Susceptibility to Lipid Peroxidation. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 141-148.
- Madrid-Bury, N., Pérez-Gutiérrez, J.F., Pérez-Garnelo, S., Moreira, P., Sanjuanbenito, B.P.,

Gutiérrez-Adán, A., Martínez, J.F., 2005. Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. *Theriogenology* 64, 232-241.

Magdaleno, L., Gasset, M., Varea, J., Schambony, A.M., Urbanke, C., Raida, M., Töpfer-Petersen, E., Calvete, J.J., 1997. Biochemical and conformational characterisation of HSP-3, a stallion seminal plasma protein of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *Febs Letters* 420, 179.

Magistrini, M., Tinel, C., Noue, P., Palmer, E., 1988. Correlations between characteristics of frozen spermatozoa from ejaculates or perfusates from epididymidis caudae and proximal deferent ducts in a group of stallions. *Proc 11th Intern Cong Anim Reprod* 17, 273.

Manjunath, P., Bergeron, A., Lefebvre, J., Fan, J., 2007. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Society of Reproduction and Fertility supplement* 65, 217.

Manjunath, P., Sairam, M.R., 1987. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem. J.* 241, 685.

Manjunath, P., Thérien, I., 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J. Reprod. Immunol.* 53, 109-119.

Mann, T., 1975. Biochemistry of stallion semen. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 47.

Marks, S., Dupuis, J., Mickelsen, W., Memon, M., Platz Jr, C., 1994. Conception by use of postmortem epididymal semen extraction in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204, 1639-1640.

Martínez-González, J., 2005. Trombospondina: ¿ un nuevo mediador de las estatinas en el endotelio? *Clínica e investigación en arteriosclerosis* 17, 283-285.

Martinez-Pastor, F., Guerra, C., Kaabi, M., Diaz, A.R., Anel, E., Herraez, P., De Paz, P., Anel, L., 2005. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. *Theriogenology* 63, 24-40.

Martinez-Soto, J.C., Garcia-Vazquez, F.A., Gumbao, D., Landeras, J., Gadea, J., 2011. Assessment of two thawing processes of cryopreserved human sperm in pellets. *Cryobiology* 63, 131-136.

Martins, C.F., Driessen, K., Costa, P.M., Carvalho-Neto, J.O., de Sousa, R.V., Rumpf, R., Dode, M.N., 2009. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 degrees C by different periods of time. *Anim. Reprod. Sci.* 116, 50-57.

Marushige, Y., Marushige, K., 1978. Phosphorylation of sperm histone during spermiogenesis in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis* 518, 440-449.

Matás, C., Decuadro, G., Martínez-Miró, S., Gadea, J., 2007. Evaluation of a cushioned method for centrifugation and processing for freezing boar semen. *Theriogenology* 67, 1087-1091.

Matas, C., Sansegundo, M., Ruiz, S., Garcia-Vazquez, F.A., Gadea, J., Romar, R., Coy, P., 2010. Sperm treatment affects capacitation parameters and penetration ability of

- ejaculated and epididymal boar spermatozoa. *Theriogenology* 74, 1327-1340.
- Matas, C., Vieira, L., Garcia-Vazquez, F.A., Aviles-Lopez, K., Lopez-Ubeda, R., Carvajal, J.A., Gadea, J., 2011. Effects of centrifugation through three different discontinuous Percoll gradients on boar sperm function. *Anim. Reprod. Sci.* 127, 62-72.
- Maxwell, W.M.C., De Graaf, S.P., Ghaoui, R.E.H., Evans, G., 2007. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Reproduction in Domestic Ruminants* 6, 13-38.
- Mazur, P., 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol Cell Physiol* 247, C125-142.
- Mazur, P., Koshimoto, C., 2002. Is intracellular ice formation the cause of death of mouse sperm frozen at high cooling rates? *Biol. Reprod.* 66, 1485-1490.
- Mazzilli, F., Rossi, T., Sabatini, L., Pulcinelli, F.M., Rapone, S., Dondero, F., Gazzaniga, P.P., 1995. Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. *Acta Eur. Fertil.* 26, 145.
- McDowell, K.J., Little, T.V., Timoney, P.J., Adams, M.H., 1996. Characterisation of proteins in the seminal plasma of stallions, geldings and geldings supplemented with testosterone. *Res. Vet. Sci.* 61, 33-37.
- McPartlin, L.A., Suarez, S.S., Czaya, C.A., Hinrichs, K., Bedford-Guaus, S.J., 2009. Hyperactivation of stallion sperm is required for successful in vitro fertilization of equine oocytes. *Biol. Reprod.* 81, 199-206.
- Melo, C., Papa, F., Alvarenga, M., 2008. Como colher e congelar sêmen de epidídimo de reprodutores terminais ou mortos, IX Conferência Anual da Associação Brasileira de Médicos Veterinários de Equídeos (ABRAVEQ), São Paulo
- Menard, M., Nauc, V., Lazure, C., Vaillancourt, D., Manjunath, P., 2003. Novel purification method for mammalian seminal plasma phospholipid-binding proteins reveals the presence of a novel member of this family of protein in stallion seminal fluid. *Mol. Reprod. Dev.* 66, 349-357.
- Merkies, K., Buhr, M.M., 1998. Epididymal maturation affects calcium regulation in equine spermatozoa exposed to heparin and glucose. *Theriogenology* 49, 683-695.
- Meyers, S.A., 2009. Sperm Physiology In: Samper, J.C. (Ed.), *Equine breeding management and artificial insemination*, Saunders Elsevier, pp. 47-56.
- Miller, C.D., 2008. Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. *Theriogenology* 70, 463-468.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A., 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)* 84, 407-412.
- Ministerio de Agricultura, P.y.A., 2003. Estudio y Caracterización del Sector Equino en España.
- Molina, J., Castilla, J.A., Gil, T., Hortas, M.L., Vergara, F., Herruzo, A., 1995. DNA and chromatin structure: Influence of incubation on the chromatin condensation and nuclear stability of human spermatozoa by flow cytometry. *Human Reproduction* 10, 1280-1286.

- Monteiro, G.A., Guasti, P.N., Papa, F.O., 2009. Colheita e preservação de células espermáticas de garanhões recuperadas da cauda do epidídimo. *Veterinária e Zootecnia* 16, 448-458.
- Monteiro, G.A., Papa, F.O., Zahn, F.S., Dellaqua, J.A., Jr., Melo, C.M., Maziero, R.R., Avanzi, B.R., Alvarenga, M.A., Guasti, P.N., 2011. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 127, 197-201.
- Montiel, E.E., Huidobro, C.C., Castellon, E.A., 2003. Glutathione-related enzymes in cell cultures from different regions of human epididymis. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 49, 95-105.
- Moore, H.D.M., 1995. Post-testicular sperm maturation and transport in the excurrent ducts. *Gametes—The Spermatozoon* (Cambridge Reviews in Human Reproduction, Press Syndicate of the University of Cambridge). Cambridge University Press, Cambridge, 140-156.
- Morris, L., Tiplady, C., Allen, W., 2002. The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology* 58, 643-646.
- Muñoz-Blanco, T., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J.A., 2008. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod. Domes. Anim.* 43 Suppl 4, 18-31.
- Müjica, A., Navarro-García, F., Hernández-González, E.O., de Lourdes Juárez-Mosqueda, M., 2003. Perinuclear theca during spermatozoa maturation leading to fertilization. *Microsc. Res. Tech.* 61, 76-87.
- Mungan, N.A., Mungan, G., Basar, M.M., Baykam, M., Atan, A., 2001. Effect of seminal plasma calcitonin levels on sperm motility. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 47, 113-117.
- Murry, R.K., Narasimhan, R., Levine, M., Shirley, M., Lingwood, C.A., Schachter, H., 1980. Galactoglycerolipids of mammalian testis, spermatozoa and nervous tissues, In: Sweeley, C. (Ed.), *Cell Surface Glycolipids*, American Chemical Society Press, pp. 105-125.
- Neild, D.M., Gadella, B.M., Chaves, M.G., Miragaya, M.H., Colenbrander, B., Aguero, A., 2003. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology* 59, 1693-1705.
- Nikolopoulou, M., Soucek, D.A., Vary, J.C., 1985. Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. *Biochim Biophys Acta* 815, 486-498.
- Nixon, B., Aitken, R.J., 2009. The biological significance of detergent-resistant membranes in spermatozoa. *J. Reprod. Immunol.* 83, 8-13.
- Nonogaki, T., Noda, Y., Narimoto, K., Shiotani, M., Mori, T., Matsuda, T., Yoshida, O., 1992. Localization of CuZn-superoxide dismutase in the human male genital organs. *Human Reproduction* 7, 81-85.
- Novak, S., Smith, T.A., Paradis, F., Burwash, L., Dyck, M.K., Foxcroft, G.R., Dixon, W.T., 2010. Biomarkers of in vivo fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. *Theriogenology* 74, 956-967.
- Oko, R., Sutovsky, P., 2009. Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. *J. Reprod. Immunol.* 83, 2-7.

- Oliva, R., 2006. Protamines and male infertility. *Human reproduction update* 12, 417-435.
- Olski, T.M., Noegel, A.A., Korenbaum, E., 2001. Parvin, a 42 kDa focal adhesion protein, related to the alpha-actinin superfamily. *J. Cell Sci.* 114, 525-538.
- Olson, G.E., Winfrey, V.P., 1992. Structural organization of surface domains of sperm mitochondria. *Mol Reprod Dev* 33, 89-98.
- Orlando, C., Casano, R., Forti, G., Barni, T., Vannelli, G.B., Balboni, G.C., Serio, M., 1988. Immunologically reactive albumin-like protein in human testis and seminal plasma. *Journal of reproduction and fertility* 83, 687-692.
- Ortega-Ferrusola, C., Garcia, B.M., Gallardo-Bolanos, J.M., Gonzalez-Fernandez, L., Rodriguez-Martinez, H., Tapia, J.A., Pena, F.J., 2009. Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 114, 393-403.
- Owen, K.R., Singer, E.R., Clegg, P.D., Ireland, J.L., Pinchbeck, G.L., 2012. Identification of risk factors for traumatic injury in the general horse population of north-west England, Midlands and north Wales. *Equine Veterinary Journal* 44, 143-148.
- Palladino, M.A., Laperche, Y., Hinton, B.T., 1994. Multiple forms of gamma-glutamyl transpeptidase messenger ribonucleic acid are expressed in the adult rat testis and epididymis. *Biol. Reprod.* 50, 320-328.
- Papa, F.O., Melo, C.M., Fioratti, E.G., Dell'aqua, J.A., Jr., Zahn, F.S., Alvarenga, M.A., 2008. Freezing of stallion epididymal sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 293-301.
- Parks, J.E., Arion, J.W., Foote, R.H., 1987. Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 37, 1249-1258.
- Parks, J.E., Graham, J.K., 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38, 209-222.
- Parks, J.E., Hammerstedt, R.H., 1985. Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biol. Reprod.* 32, 653-668.
- Parks, J.E., Lynch, D.V., 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29, 255-266.
- Parrish, J., Krogenaes, A., Susko-Parrish, J., 1995. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 44, 859-869.
- Parrish, J., Susko-Parrish, J., Winer, M., First, N., 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38, 1171-1180.
- Pearl, C.A., Mason, H., Roser, J.F., 2011. Immunolocalization of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and androgen receptor in the pre-, peri- and post-pubertal stallion testis. *Anim. Reprod. Sci.* 125, 103-111.
- Peña, F.J., García, B.M., Samper, J.C., Aparicio, I.M., Tapia, J.A., Ferrusola, C.O., 2011. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology* 76, 1177-1186.
- Perez-Pe, R., Grasa, P., Fernandez-Juan, M., Peleato, M.L., Cebrian-Perez, J.A., Muino-Blanco, T., 2002. Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 61, 226-233.

- Perry, A.C., Jones, R., Hall, L., 1993. Isolation and characterization of a rat cDNA clone encoding a secreted superoxide dismutase reveals the epididymis to be a major site of its expression. *Biochem. J.* 293, 21.
- Pesch, S., Bergmann, M., 2006. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron* 37, 597-612.
- Pesch, S., Bergmann, M., Bostedt, H., 2006. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. *Theriogenology* 66, 307-313.
- Phalipon, A., Corthésy, B., 2003. Novel functions of the polymeric Ig receptor: well beyond transport of immunoglobulins. *Trends in immunology* 24, 55-58.
- Pickett, B.W., Faulkner, L.C., Seidel Jr, G.E., Berndtson, W.E., Voss, J.L., 1976. Reproductive Physiology of the Stallion. IV. Seminal and Behavioral Characteristics. *Journal Of Animal Science* 43, 617-625.
- Pickett, B.W., Faulkner, L.C., Sutherland, T.M., 1970. Effect of month and stallion on seminal characteristics and sexual behavior. *J Anim Sci* 31, 713-728.
- Pickett, B.W., Sullivan, J.J., Seidel, G.E., Jr., 1975. Reproductive physiology of the stallion. V. Effect of frequency of ejaculation on seminal characteristics and spermatozoal output. *J Anim Sci* 40, 917-923.
- Pommer, A.C., Rutllant, J., Meyers, S.A., 2002. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. *Theriogenology* 58, 1373-1384.
- Pommer, A.C., Rutllant, J., Meyers, S.A., 2003. Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biol. Reprod.* 68, 1208-1214.
- Potgieter, F.T., Stoltz, W.H., Blouin, E.F., Roos, J.A., 1988. Corridor disease in South Africa: a review of the current status. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 59, 155.
- Poulos, A., Brown-Woodman, P.D.C., White, I.G., Cox, R.I., 1975. Changes in phospholipids of ram spermatozoa during migration through the epididymis and possible origin of prostaglandin F<sub>2α</sub> in testicular and epididymal fluid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 388, 12-18.
- Poulos, A., Voglmayr, J.K., White, I.G., 1973. Phospholipid changes in spermatozoa during passage through the genital tract of the bull. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 306, 194-202.
- Proudman, C., Pinchbeck, G., Clegg, P., French, N., 2004. Equine welfare: Risk of horses falling in the Grand National. *Nature* 428, 385-386.
- Purohit, S.B., Laloraya, M., Kumar, G.P., 1999. Role of ions and ion channels in capacitation and acrosome reaction of spermatozoa. *Asian J Androl* 1, 95-107.
- Rana, A.P.S., Majumder, G.C., Misra, S., Ghosh, A., 1991. Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1061, 185-196.
- Reckova, Z., Machatkova, M., Rybar, R., Horakova, J., Hulinska, P., Machal, L., 2008. Evaluation of chromatin integrity of motile bovine spermatozoa capacitated in vitro. *Zygote* 16, 195-202.

- Reinert, M., Calvete, J.J., Sanz, L., Topfer-Petersen, E., 1997. Immunohistochemical localization in the stallion genital tract, and topography on spermatozoa of seminal plasma protein SSP-7, a member of the spermadhesin protein family. *Andrologia* 29, 179-186.
- Rejraji, H., Sion, B., Prensier, G., Carreras, M., Motta, C., Frenoux, J.M., Vericel, E., Grizard, G., Vernet, P., Drevet, J.R., 2006. Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biol. Reprod.* 74, 1104-1113.
- Revah, I., Gadella, B.M., Flesch, F.M., Colenbrander, B., Suárez, S.S., 2000. Physiological state of bull sperm affects fucose- and mannose-binding properties. *Biol. Reprod.* 62, 1010-1015.
- Robaire, B., Hales, B.F., 1982. Regulation of epididymal glutathione S-transferases: effects of orchidectomy and androgen replacement. *Biol. Reprod.* 26, 559-565.
- Robaire, B., Hinton, B.T., Orgebin-Crist, M.C., 2006. The epididymis. *Physiology of reproduction* 1, 1071-1148.
- Robert, M., Gibbs, B.F., Jacobson, E., Gagnon, C., 1997. Characterization of prostate-specific antigen proteolytic activity on its major physiological substrate, the sperm motility inhibitor precursor/semenogelin I. *Biochemistry (Mosc)*. 36, 3811-3819.
- Roberts, K.P., Hoffman, L.B., Ensrud, K.M., Hamilton, D.W., 2001. Expression of crisp-1 mRNA splice variants in the rat epididymis, and comparative analysis of the rat and mouse crisp-1 gene regulatory regions. *J. Androl.* 22, 157.
- Roldán, E.R.S., Garde, J.J., 2004. 14. Biotecnología de la reproducción y conservación de especies en peligro de extinción.
- Roldan, E.R.S., Gomendio, M., Garde, J.J., Espeso, G., Ledda, S., Berlinguer, F., Del Olmo, A., Soler, A.J., Arregui, L., Crespo, C., 2006. Inbreeding and reproduction in endangered ungulates: preservation of genetic variation through the organization of genetic resource banks. *Reprod. Domest. Anim.* 41, 82-92.
- Ronquist, G., Brody, I., 1985. The prostasome: its secretion and function in man. *Biochim Biophys Acta* 822, 203-218.
- Rümke, P., 1974. The origin of immunoglobulins in semen. *Clin. Exp. Immunol.* 17, 287.
- Ruoslahti, E., 1989. Proteoglycans in cell regulation. *Journal of Biological Chemistry* 264, 13369-13372.
- Saalmann, A., Münz, S., Ellerbrock, K., Ivell, R., Kirchhoff, C., 2000. Novel sperm-binding proteins of epididymal origin contain four fibronectin type II-modules. *Mol. Reprod. Dev.* 58, 88-100.
- Sabeur, K., Ball, B.A., 2006. Detection of superoxide anion generation by equine spermatozoa. *American journal of veterinary research* 67, 701-706.
- Sabeur, K., Ball, B.A., 2007. Characterization of NADPH oxidase 5 in equine testis and spermatozoa. *Reproduction* 134, 263-270.
- Safarinejad, M.R., Hosseini, S.Y., Dadkhah, F., Asgari, M.A., 2010. Relationship of omega-3 and omega-6 fatty acids with semen characteristics, and anti-oxidant status of seminal plasma: a comparison between fertile and infertile men. *Clinical Nutrition* 29, 100-105.

- Salamon, S., Maxwell, W.M.C., 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 77-111.
- Samper, J.C., 2009. Equine breeding management and artificial insemination. WB Saunders Company.
- Sanocka, D., Kurpisz, M., 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2, 1-7.
- Saravia, F., Hernández, M., Wallgren, M., Johannisson, A., Rodríguez Martínez, H., 2007. Controlled cooling during semen cryopreservation does not induce capacitation of spermatozoa from two portions of the boar ejaculate. *International journal of andrology* 30, 485-499.
- Saravia, F., Wallgren, M., Johannisson, A., Calvete, J.J., Sanz, L., Peña, F.J., Roca, J., Rodríguez-Martínez, H., 2009. Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in MiniFlatPacks. *Theriogenology* 71, 662-675.
- Schambony, A., Gentzel, M., Wolfes, H., Raida, M., Neumann, U., Topfer-Petersen, E., 1998. Equine CRISP-3: primary structure and expression in the male genital tract. *Biochim Biophys Acta* 1387, 206-216.
- Schröter, S., Derr, P., Conradt, H.S., Nimitz, M., Hale, G., Kirchoff, C., 1999. Male-specific modification of human CD52. *Journal of Biological Chemistry* 274, 29862-29873.
- Sebastian, S.M., Selvaraj, S., Aruldas, M.M., Govindarajulu, P., 1987. Pattern of neutral and phospholipids in the semen of normospermic, oligospermic and azoospermic men. *J. Reprod. Fertil.* 79, 373-378.
- Sengupta, P., Baird, B., Holowka, D., 2007. Lipid rafts, fluid/fluid phase separation, and their relevance to plasma membrane structure and function, *Semin. Cell Dev. Biol.*, Elsevier, pp. 583-590.
- Sharma, R.K., Padron, O.F., Thomas, A.J., Agarwal, A., 1997. Factors associated with the quality before freezing and after thawing of sperm obtained by microsurgical epididymal aspiration. *Fertil. Steril.* 68, 626-631.
- Sikka, S.C., 2004. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J. Androl.* 25, 5.
- Simons, K., Toomre, D., 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-39.
- Smith, T.T., Yanagimachi, R., 1989. Capacitation status of hamster spermatozoa in the oviduct at various times after mating. *Journal of reproduction and fertility* 86, 255-261.
- Smits, K., Hoogewijs, M., Woelders, H., Daels, P., Van Soom, A., 2012. Breeding or assisted reproduction? Relevance of the horse model applied to the conservation of endangered equids. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 239-248.
- Soler, C., Gaßner, P., Nieschlag, E., de Montserrat, J.J., Gutiérrez, R., Sancho, M., Buendía, P., Álvarez, J.G., Behre, H.M., Cooper, T.G., 2005. Utilización del Integrated Semen Analysis System (ISAS)® para el análisis morfométrico espermático humano y su significado en las técnicas de reproducción asistida. *Revista Internacional de Andrología* 3, 112-119.

- Songsasen, N., Tong, J., Leibo, S.P., 1998. Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to twenty-four hours after death. *Journal of Experimental Zoology* 280, 189-196.
- Sostaric, E., Aalberts, M., Gadella, B.M., Stout, T.A., 2008. The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 237-248.
- Squires, E., 2005. Integration of future biotechnologies into the equine industry. *Anim. Reprod. Sci.* 89, 187-198.
- Srivastava, K., Dash, D., 2001. Altered membrane fluidity and signal transduction in the platelets from patients of thrombotic stroke. *Mol. Cell. Biochem.* 224, 143-149.
- Stubbs, C.D., Smith, A.D., 1984. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim. Biophys. Acta* 779, 89.
- Suarez, S.S., Revah, I., Lo, M., Kölle, S., 1998. Bull sperm binding to oviductal epithelium is mediated by a Ca<sup>2+</sup>-dependent lectin on sperm that recognizes Lewis-a trisaccharide. *Biol. Reprod.* 59, 39-44.
- Sullivan, R., Frenette, G., Girouard, J., 2007. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian Journal of Andrology* 9, 483-491.
- Suzuki, F., 1982. Microvasculature of the mouse testis and excurrent duct system. *Am. J. Anat.* 163, 309-325.
- Swinker, A.M., Tozer, P.R., Shields, M.L., Landis, E.R., 2003. Pennsylvania's equine industry inventory, basic economic and demographic characteristics. The Pennsylvania State University. Department of Dairy and Animal Science. s.
- Taberner, E., Morato, R., Mogas, T., Miro, J., 2010. Ability of Catalanian donkey sperm to penetrate zona pellucida-free bovine oocytes matured in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 118, 354-361.
- Takano, H., Abe, K., Ito, T., 1981. [Changes in the mouse epididymis after ligation of the ductuli efferentes or proximal epididymal duct: qualitative and quantitative histological studies (author's transl)]. *Kaibogaku Zasshi.* 56, 79-90.
- Tamayo-Canul, J., Alvarez, M., Lopez-Uruena, E., Nicolas, M., Martinez-Pastor, F., Anel, E., Anel, L., de Paz, P., 2011. Undiluted or extended storage of ram epididymal spermatozoa as alternatives to refrigerating the whole epididymes. *Anim. Reprod. Sci.* 126, 76-82.
- Tapia, J.A., Macias-Garcia, B., Miro-Moran, A., Ortega-Ferrusola, C., Salido, G.M., Pena, F.J., Aparicio, I.M., 2012. The membrane of the mammalian spermatozoa: much more than an inert envelope. *Reprod. Domes. Anim.* 47 Suppl 3, 65-75.
- Tardif, S., Dube, C., Chevalier, S., Bailey, J.L., 2001. Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biol. Reprod.* 65, 784-792.
- Tauber, P.F., Zaneveld, L.J., Propping, D., Schumacher, G.F., 1975. Components of human split ejaculates. I. Spermatozoa, fructose, immunoglobulins, albumin, lactoferrin, transferrin and other plasma proteins. *J. Reprod. Fertil.* 43, 249-267.

- Tavilani, H., Goodarzi, M.T., Doosti, M., Vaisi-Raygani, A., Hassanzadeh, T., Salimi, S., Joshaghani, H.R., 2008. Relationship between seminal antioxidant enzymes and the phospholipid and fatty acid composition of spermatozoa. *Reproductive Biomedicine Online* 16, 649-656.
- Thomas, C.A., Garner, D.L., DeJarnette, J.M., Marshall, C.E., 1998. Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 58, 786-793.
- Thuwanut, P., Chatdarong, K., Techakumphu, M., Axner, E., 2008. The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. *Theriogenology* 70, 233-240.
- Tiplady, C., Morris, L.H.A., Allen, W., 2002. Stallion epididymal spermatozoa: pre-freeze and post-thaw motility and viability after three treatments. *Theriogenology* 58, 225-228.
- Tischner, M., 1979. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *J Reprod Fertil Suppl* 27, 53-59.
- Tittarelli, C., Savignone, C.A., Arnaudin, E., Stornelli, M.C., Stornelli, M.A., de la Sota, R.L., 2006. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology* 66, 1637-1640.
- Topfer-Petersen, E., Ekhlesi-Hundrieser, M., Kirchhoff, C., Leeb, T., Sieme, H., 2005. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Anim. Reprod. Sci.* 89, 159-170.
- Toyonaga, M., Kaihara, A., Tsutsui, T., 2011. The Quality of Cryopreserved Sperm Collected from Feline Caudal Epididymides Stored at Room Temperature. *J. Vet. Med. Sci.* 73, 1395.
- Toyonaga, M., Sato, Y., Morita, M., Watanabe, M., Oba, H., Mizutani, T., Hori, T., Tsutsui, T., 2010. The qualities of cryopreserved epididymal sperm collected from feline epididymides stored at low temperature. *J. Vet. Med. Sci.* 72, 777-780.
- Tramer, F., Rocco, F., Micali, F., Sandri, G., Panfili, E., 1998. Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 59, 753-758.
- Travis, A.J., Merdiushev, T., Vargas, L.A., Jones, B.H., Purdon, M.A., Nipper, R.W., Galatioto, J., Moss, S.B., Hunnicutt, G.R., Kopf, G.S., 2001. Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts, in mouse and Guinea pig spermatozoa. *Developmental Biology* 240, 599-610.
- Tulsiani, D.R., 2003. Glycan modifying enzymes in luminal fluid of rat epididymis: are they involved in altering sperm surface glycoproteins during maturation? *Microsc. Res. Tech.* 61, 18-27.
- Tulsiani, D.R., Orgebin-Crist, M.C., Skudlarek, M.D., 1998. Role of luminal fluid glycosyltransferases and glycosidases in the modification of rat sperm plasma membrane glycoproteins during epididymal maturation. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 53, 85.
- Tulsiani, D.R., Yoshida-Komiya, H., Araki, Y., 1997. Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. *Biol. Reprod.* 57, 487-494.
- Turner, R., McDonnell, S.M., Hawkins, J.F., 1995. Use of pharmacologically induced ejaculation to obtain semen from a stallion with a fractured radius. *J Am Vet Med Assoc* 206, 1906-1908.

- Turner, T.T., 2002. Necessity's potion: inorganic ions and small organic molecules in the epididymal lumen. *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice. A Comprehensive Survey of the Efferent Ducts, the Epididymis and the Vas Deferens*, 131-150.
- Turner, T.T., 2008. De Graaf's thread: the human epididymis. *J. Androl.* 29, 237-250.
- Turner, T.T., Bomgardner, D., Jacobs, J.P., Nguyen, Q.A., 2003. Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction* 125, 871-878.
- Udby, L., Bjartell, A., Malm, J., Egesten, A., Lundwall, A., Cowland, J.B., Borregaard, N., Kjeldsen, L., 2005. Characterization and localization of cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) in the human male reproductive tract. *J. Androl.* 26, 333-342.
- Veri, J.P., Hermo, L., Robaire, B., 1994. Immunocytochemical localization of glutathione S-transferase Yo subunit in the rat testis and epididymis. *J. Androl.* 15, 415.
- Vidament, M., Dupere, A.M., Julienne, P., Evain, A., Noue, P., Palmer, E., 1997. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology* 48, 907-917.
- Vidament, M., Yvon, J.M., Couty, I., Arnaud, G., Nguekam-Feugang, J., Noue, P., Cottron, S., Le Tellier, A., Noel, F., Palmer, E., Magistrini, M., 2001. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA82. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 201-218.
- Villemure, M., Lazure, C., Manjunath, P., 2003. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 1477-7827.
- Visconti, P.E., Kopf, G.S., 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 59, 1.
- Voglmayr, J.K., Fairbanks, G., Jackowitz, M.A., Colella, J.R., 1980. Post-testicular developmental changes in the ram sperm cell surface and their relationship to luminal fluid proteins of the reproductive tract. *Biol. Reprod.* 22, 655-667.
- Voglmayr, J.K., Fairbanks, G., Lewis, R.G., 1983. Surface glycoprotein changes in ram spermatozoa during epididymal maturation. *Biol. Reprod.* 29, 767-775.
- Volkman, D., Gerber, D., Erb, H., 2001. Comparison between freezability of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 340.
- Walker, M.G., Volkuth, W., 2002. Cell adhesion and matrix remodeling genes identified by co-expression analysis. *Gene Function & Disease* 3, 109-112.
- Wang, G.-H., Yao, L., Xu, H.-W., Tang, W.-T., Fu, J.-H., Hu, X.-F., Cui, L., Xu, X.-M., 2013. Identification of MXRA5 as a novel biomarker in colorectal cancer. *Oncology letters* 5, 544.
- Wang, K.-S., Liu, X., Zhang, Q., Pan, Y., Aragam, N., Zeng, M., 2011. A meta-analysis of two genome-wide association studies identifies 3 new loci for alcohol dependence. *J. Psychiatr. Res.* 45, 1419-1425.
- Weston, V.L., McLeay, L., Morris, L.H., 2005. The in vitro response of equine epididymal and ejaculated spermatozoa to caffeine. *Anim. Reprod. Sci.* 89, 272-275.
- Wildt, D.E., Bush, M., Goodrowe, K.L., Packer, C., Pusey, A.E., Brown, J.L., Joslin, P., O'Brien, S.J., 1987. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion

populations. *Nature* 329, 328-331.

Wildt, D.E., Rall, W.F., Critser, J.K., Monfort, S.L., Seal, U.S., 1997. Genome resource banks. *Bioscience*, 689-698.

Wolf, D.E., Lipscomb, A.C., Maynard, V.M., 1988. Causes of nondiffusing lipid in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biochemistry (Mosc)*. 27, 860-865.

Woods, E.J., Benson, J.D., Agca, Y., Critser, J.K., 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 48, 146-156.

Wouters-Tyrou, D., Martinage, A., Chevaillier, P., Sautiere, P., 1998. Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie* 80, 117-128.

Wrench, N., Pinto, C.R., Klinefelter, G.R., Dix, D.J., Flowers, W.L., Farin, C.E., 2010. Effect of season on fresh and cryopreserved stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.* 119, 219-227.

Xiong, D., Li, G., Li, K., Xu, Q., Pan, Z., Ding, F., Vedell, P., Liu, P., Cui, P., Hua, X., 2012. Exome sequencing identifies MXRA5 as a novel cancer gene frequently mutated in non-small cell lung carcinoma from Chinese patients. *Carcinogenesis* 33, 1797-1805.

Yangimachi, R., 1994. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 2, 371-372.

Yoneda, A., Kashima, M., Yoshida, S., Terada, K., Nakagawa, S., Sakamoto, A., Hayakawa, K., Suzuki, K., Ueda, J., Watanabe, T., 2006. Molecular cloning, testicular postnatal expression, and oocyte-activating potential of porcine phospholipase C $\zeta$ . *Reproduction* 132, 393-401.

Yoshida, R., Nukiwa, T., Watanabe, Y., Fujiwara, M., Hirata, F., Hayaishi, O., 1980. Regulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase activity in the small intestine and the epididymis of mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 203, 343-351.

Yvonne Olsson, A., Lilja, H., Lundwall, Å., 2004. Taxon-specific evolution of glandular kallikrein genes and identification of a progenitor of prostate-specific antigen. *Genomics* 84, 147-156.

Zalata, A.A., Christophe, A.B., Depuydt, C.E., Schoonjans, F., Comhaire, F.H., 1998. The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 111-118.

Zomborszky, Z., Zubor, T., Toth, J., Horn, P., 1999. Sperm collection from shot red deer stags (*Cervus elaphus*) and the utilization of sperm frozen subsequently thawed. *Acta Vet. Hung.* 47, 263-270.

Zoppino, F.C., Halon, N.D., Bustos, M.A., Pavarotti, M.A., Mayorga, L.S., 2012. Recording and sorting live human sperm undergoing acrosome reaction. *Fertil. Steril.* 97, 1309-1315.