



Tesis Doctoral

**“ Fisiología celular y calidad seminal durante la conservación del semen porcino refrigerado ”**

**David Martín Hidalgo**

Facultad de Veterinaria  
Departamento de Medicina Animal

2013



# **Fisiología celular y calidad seminal durante la conservación del semen porcino refrigerado**

**David Martín Hidalgo**

**Facultad de Veterinaria**

**Departamento de Medicina Animal**

**2013**



**Dra. María Cruz Gil Anaya** Profesora Titular en el Departamento de Medicina Animal, **Dra. María Julia Bragado González** Profesora Titular en el Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética y **Dr. Luis J. García Marín**, Profesor Titular en el Departamento de Fisiología en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura,

#### INFORMAN

Que la presente memoria, presentada por **D. David Martín Hidalgo**, con el título **“Fisiología celular y calidad seminal durante la conservación del semen porcino refrigerado”**, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Medicina Animal y en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Universidad de Extremadura. Durante el periodo de realización de la Tesis, David Martín Hidalgo realizó una estancia de 3 meses en la Unidad de Medicina y Clínica de la Reproducción, en la Universidad de Medicina Veterinaria de Hannover (Alemania). La Tesis ha sido informada favorablemente por dos expertos Internacionales en el área de la Reproducción Animal. Consideramos que la Tesis reúne los requisitos para ser juzgada y para optar a la mención “Doctor Internacional” y autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente informe en Cáceres, a 25 de Septiembre de 2013.

Fdo.: Dña. M. Cruz Gil Anaya

Fdo.: D. Luís J. García Marín

Fdo.: Dña. M. Julia Bragado González



LOS RESULTADOS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL HAN SIDO PUBLICADOS EN LAS SIGUIENTES REVISTAS INTERNACIONALES:

**1-Inter- and intra-breed comparative study of sperm motility and viability in Iberian and Duroc boar semen during long-term storage in MR-A and XCell extenders.** Martín-Hidalgo D, Barón FJ, Robina A, Bragado MJ, Llera AH, García-Marín LJ, Gil MC. Anim Reprod Sci. 2013 Jun; 139(1-4):109-14. doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.04.001. Epub 2013 Apr 12.

**2-The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 °C.** Martín-Hidalgo D, Barón FJ, Bragado MJ, Carmona P, Robina A, García-Marín LJ, Gil MC. Theriogenology. 2011 May;75(8):1550-60. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.12.021. Epub 2011 Feb 12.

**3-The Effect of Resveratrol on the Quality of Extended Boar Semen During Storage at 17°C.** David Martín-Hidalgo, Ana Hurtado de Llera, Heiko Henning, Ulrike Wallner, Dagmar Waberski, Maria Julia Bragado, Maria Cruz Gil, Luis Jesus García-Marín. Journal of Agricultural Science. 2013; 5(8) 231-242. doi:10.5539/jas.v5n8p231.

**4-Adenosine monophosphate-activated kinase, AMPK, is involved in the maintenance of the quality of extended boar semen during long-term storage.** Martin-Hidalgo D, Hurtado de Llera A, Yeste M, Gil MC, Bragado MJ, Garcia-Marin LJ. Theriogenology. 2013 Sep 1;80(4):285-94. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.02.015. Epub 2013 Jun 14.

ADEMÁS, LOS RESULTADOS TAMBIÉN HAN SIDO PUBLICADOS EN LOS SIGUIENTES CONGRESOS CIENTÍFICOS INTERNACIONALES:

*Comunicaciones Orales:*

**-Effects of AMP-activated kinase inhibitor compound C in the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 °C.** D Martín-Hidalgo, A Hurtado de Llera, MC Gil, MJ Bragado, LJ García-Marín. The 7<sup>th</sup> International Conference on Boar Semen Preservation. Bonn, Germany (2011)

**-The Effect of Resveratrol on the Quality of Extended Boar Semen During Storage at 17°C.** David Martín-Hidalgo, Ana Hurtado de Llera, Heiko Henning, Ulrike Wallner, Dagmar Waberski, Maria Julia Bragado, Maria Cruz Gil, Luis Jesus García-Marín. 17<sup>th</sup> Conference of the ESDAR. Bologna, Italy (2013)

*Pósters*

**-Effects of storage and commercial semen extenders on sperm motility characteristics in cooled semen of Duroc and Iberian pigs.** M C Gil, MJ Bragado, A Robina, J Viguera, FJ Barón, D Martín-Hidalgo, LJ García-Marín. 13<sup>th</sup> Conference of the ESDAR. Ghent, Belgium (2009)

**-Effect of melatonin on seminal quality in cooled boar semen doses during 7-days storage.** D Martín-Hidalgo, LJ García-Marín, MJ Bragado, FJ Barón, MC Gil. 14<sup>th</sup> Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction. Eger, Hungary (2010).

Este trabajo de investigación ha sido realizado con cargo a los siguientes proyectos:

\*Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL 2010-15188): “Función de la proteína quinasa activada por AMP, AMPK, en la célula germinal masculina: posible aplicación biotecnológica a la conservación se semen porcino”.

\*Gobierno de Extremadura (PRI 09A077) “Función de la proteína quinasa AMPK en la célula germinal masculina: aplicación a la optimización del protocolo de criopreservación de semen de cerdo ibérico”.

\* Gobierno de Extremadura –PDT 08A057.

\*Universidad de Extremadura- Ayudas a Grupos (GRU-09019/GRU-06116).

David Martín Hidalgo ha disfrutado de una beca-contrato de Formación de Personal Investigador (FPI) del Gobierno de Extremadura (PRE 09015).







# **Agradecimientos**



En este apartado me gustaría que quedara reflejado mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible que este trabajo haya sido finalizado y espero que me puedan perdonar todas aquéllas que aún participando en él se me haya olvidado mencionarlas. En primer lugar, tengo que agradecer a mi familia el apoyo que me ha dado durante estos últimos tiempos, donde uno se agobia con facilidad y todo parece estar cuesta arriba, gracias por la paciencia que habéis mostrado conmigo, por apoyarme y animarme en esos momentos en los que estás más bajos de ánimos. Destacar entre ellos la labor de mis padres que comenzó hace ya bastante tiempo, porque sin su educación y sin valores como son la perseverancia, esfuerzo y ganas de superación ninguna tesis doctoral puede llegar a término. Gracias Noelia por haberme apoyado y soportado durante parte del trayecto que ha concluido en esta tesis doctoral . Gracias José por haberme ayudado con el diseño de la portada.

También tengo que agradecer la confianza que depositó en mí el grupo de investigación SINTREP. Gracias a Cruz por haberme enseñado a desenvolverme en el laboratorio, por las horas que pasamos en el citómetro de flujo, enseñándome su manejo y por las posteriores aportaciones para perfeccionar y poner a punto nuevos protocolos. Además, gracias a Cruz he aprendido la importancia de la tan “amada” estadística, lo poco que sé de este tema te lo debo a ti, gracias por tu tiempo y paciencia explicándome el manejo del SPSS. También debo agradecerte el tiempo que hemos pasado haciendo ecografías e inseminando las vacas, una formación que he recibido sin estar directamente implicada en la tesis, pero apasionante y que muchas veces me sirvió para desconectar. Esta tesis no podría haber sido finalizada sin la aportación de Julia, que me abrió las puertas de un nuevo mundo: “el fabuloso mundo de las proteínas”, un tema algo difícil para un veterinario pero apasionante una vez que te metes dentro de él. Además debo agradecerte tu disposición a corregir cualquier texto y las rápidas traducciones al inglés, espero tener algún día tu nivel de control sobre este idioma. Gracias a Luis por las horas que hemos pasado revisando datos en tu despacho, algún día espero tener tu agudeza visual para de un simple vistazo, ver un gráfico y tener una idea

del estado del experimento en cuestión. Además me enseñaste a hacer western y a usar activadores, inhibidores, bloqueantes, pensar sobre el porcentaje de DMSO o etanol en la muestra, etc.

Cruz debido a su formación veterinaria siempre buscó la aplicación de nuestros experimentos a la vida real: a las granjas y centros de producción de dosis seminales; sin embargo Julia siempre orientó los trabajos hacia la investigación básica, saber por qué existe algo y qué función tiene en la célula; finalmente Luis supo aunar ambos pensamientos y quedaron unos artículos bastantes completos, donde hemos hecho investigación básica pero buscando siempre su aplicación práctica. Gracias a los tres tutores por vuestra dedicación y orientación sin la cual no podría haber finalizado esta tesis doctoral. No me puedo olvidar de mi compañera Ana, “la despensa abierta de Bioquímica”, que me ha acompañado en estos años donde hemos ambos hemos ido completando nuestras respectivas tesis doctorales. Ana nunca dijo NO a cualquier solución stock que le pidiera, siempre estaban a punto y me los ofreció sin pedir nada a cambio, también tengo que agradecerle sus consejos y ayuda para realizar los western blots. Por supuesto también sirvieron de mucho los cafés de máquina y su compañía durante nuestra estancia investigadora en Barcelona. Hablando de Barcelona, tengo que agradecer al Profesor Juan Enrique Rodríguez Gil y a Marc Yeste, que nos recibieran en su laboratorio y nos ofrecieran su ayuda y orientación para obtener unas preciosas imágenes de espermatozoides mediante la técnica de inmunocitoquímica con un microscopio confocal, que han sido usadas en uno de los artículos de esta Tesis Doctoral. También debo acordarme de Efrén que nos ayudó con la técnica y nos acompañó en todo momento por esos interminables pasillos de la Universidad Autónoma de Barcelona.

También tengo que agradecer su ayuda y colaboración a todas las personas que trabajan en el centro de producción de dosis seminales Tecnogenext, especialmente a Conchi, Martina y Curro que siempre atendieron nuestras peticiones, incluso los días con más carga de trabajo (lunes), donde cualquier petición extra siempre cuesta más satisfacer.

Thank you, Professor Waberski, for picking me up in the train station, receiving me into your laboratory and allowing me to complete an important part of results of my doctoral thesis in Hannover. Thank you, Heiko, for helping me with the protocols and with the interpretation of the results. Thank you, Uli and Quyn, for helping me to complete our "ATP challenge" without you I would not had been able to finish it on time. Thank you, Anja, for your assistance with the flow cytometer and for your help in the lab.



## **ABREVIATURAS:**

**ACC:** acetil-Coa-carboxilasa

**ACs:** adenilato ciclasa

**APS:** persulfato amónico

**ATP:** adenosín trifosfato

**AMPC:** adenosín monofosfato cíclico

**AMPK:** quinasa activada por AMP

**BHA:** butil hidroxianisol-INS 320

**BHT:** butil hidroxitolueno-INS 321

**BSA:** albúmina sérica bovina

**BSP:** plasma seminal bovino

**BTS:** solución de congelación de Beltsville (Beltsville Thawing Solution)

**CaMKK:** proteína quinasa de la quinasa dependiente de calcio y calmodulina

**CAT:** catalasa

**DAPI:** 4.6-diamidino-2-phenylindole clorhidrato

**DES:** dietilestilbestrol

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**GMPC:** guanosín monofosfato cíclico

**GPx:** glutatión peroxidasa



**GR:** glutatión reductasa

**GSH:** glutatión

**G6PD:** glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

**HUMT:** hidroxil-indol metil transferasa

**ICSI:** inyección intracitoplasmática

**IP:** ioduro de propidio

**LOP:** peroxidación lipídica

**MDA:** malondialdehído

**MMP:** potencial de membrana mitocondrial

**NAT:** N-acetil transferasa

**PBS:** tampón fosfato salino

**PDE:** fosfodiesterasa

**PHGPx:** fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa

**PL:** fosfolipasa

**PUFAs:** ácidos grasos poliinsaturados

**SIRT:** sirtuína

**SOD:** superóxido dismutasa

**TBS:** tampón salino Tris

**TZDs:** tiazolidinedionas

# **Índice**

---



# ÍNDICE

❖ Resumen/Summary .....	1
❖ INTRODUCCIÓN .....	9
➤ El espermatozoide .....	11
▪ Espermatogénesis .....	11
▪ Maduración epididimaria .....	12
▪ Estructura del espermatozoide .....	13
➤ Breve reseña histórica de la inseminación artificial porcina .....	15
➤ Inseminación artificial con semen refrigerado.....	19
➤ Efectos de la conservación de espermatozoides .....	29
➤ Estrés oxidativo durante la conservación del semen .....	31
➤ Efecto de antioxidantes añadidos al semen .....	37
➤ Efecto de la dilución en la IA porcina con semen refrigerado .....	44
➤ Melatonina y sus propiedades protectoras .....	46
➤ Resveratrol y sus propiedades protectoras .....	54
➤ Metabolismo celular: AMPK.....	60
❖ Objetivos .....	69
❖ Material y Métodos .....	73
➤ Animales y obtención de muestras .....	75
➤ Evaluación de la motilidad mediante sistema CASA.....	78
➤ Análisis por Citometría de flujo .....	80
▪ Evaluación de la viabilidad espermática: .....	82
▪ Evaluación de la integridad de la membrana acrosómica .....	83
▪ Evaluación de la fluidez de la membrana plasmática.....	84
▪ Evaluación del estado del potencial de membrana mitocondrial.....	86
▪ Evaluación del contenido de calcio intracelular .....	87
➤ Western blotting.....	90
➤ Inmunolocalización de la proteína AMPK- $\alpha$ (inmunofluorescencia).....	99
➤ Cuantificación del nivel celular de ATP .....	101
❖ Discusión .....	103
❖ Conclusiones/ Conclusions.....	123
❖ Bibliografía .....	129
❖ Anexos.....	181
➤ Anexo -1 .....	183
➤ Anexo-2 .....	190
➤ Anexo- 3 .....	212
➤ Anexo-4 .....	232



# **Resumen/Summary**



En la actualidad, una de las técnicas más usadas en la tecnología de la reproducción porcina es la inseminación artificial con semen refrigerado. Para que los espermatozoides conserven su capacidad fecundante durante varios días, los eyaculados son diluidos con diluyentes comerciales, de corta y larga duración, para producir dosis seminales que serán posteriormente conservadas a 15-17°C hasta el día de su uso, normalmente en un periodo inferior a 5 días. Es precisamente el diluyente uno de los factores que influyen en la tolerancia de los espermatozoides a la conservación mediante refrigeración. La diferencia entre los diluyentes deriva de su composición; esta diferencia hace que unos diluyentes conserven mejor el semen porcino que otros, como así se ha demostrado en numerosos estudios. Sin embargo, hay muy pocas referencias bibliográficas con respecto al papel de la raza del macho en la tolerancia de los espermatozoides a la conservación en un diluyente determinado. Es por ello que en la presente tesis doctoral nos propusimos estudiar la capacidad de conservación de dosis seminales de dos diluyentes de amplio uso, MRA y X-Cell, teniendo en cuenta la raza como posible fuente de variación. De nuestro estudio podemos concluir que cada raza se adapta de manera diferente a los distintos diluyentes en términos de comportamiento de la motilidad objetiva durante el periodo de conservación; además, para un mismo diluyente también se observaron diferencias en función de la raza en estudio. Así, y como resultados a destacar, en términos de mayor motilidad progresiva podríamos decir que el diluyente más indicado para la raza Ibérica sería el X-Cell y que la magnitud de las diferencias entre razas puede variar en función del diluyente utilizado. Por lo tanto, y en virtud de la variabilidad observada entre diluyentes para una raza concreta, podemos recomendar que los estudios que se planteen comparar la eficacia de varias diluyentes durante la conservación lo hagan para una raza en concreto.

Es conocido que las dosis seminales van perdiendo con el tiempo la capacidad fecundante cuando son conservadas a 17°C. Esta disminución de la capacidad fecundante podría estar asociada a la composición lipídica de la membrana del espermatozoide de cerdo, que contiene una gran cantidad de ácidos



grasos poliinsaturados, lo que los hace muy susceptibles a la oxidación; es por ello que se han añadido distintas sustancias antioxidantes a las dosis seminales para mejorar esta menor calidad espermática. Por este motivo en la presente tesis doctoral nos propusimos usar dos antioxidantes: melatonina (1  $\mu\text{M}$ ) y resveratrol (10, 33, 66 y 100  $\mu\text{M}$ ), en función de los resultados favorables obtenidos en la conservación de espermatozoides de otras especies. Sin embargo, nuestros resultados en la especie porcina no nos permiten aconsejar el uso de estos dos antioxidantes para mejorar la conservación de dosis seminales durante 7 días a 17°C al haberse observado, tras la adición de melatonina, una disminución del porcentaje de espermatozoides móviles y, especialmente el día 7 de conservación, una disminución de la viabilidad y de la velocidad de los espermatozoides. Con el uso del resveratrol se observa una disminución del porcentaje de espermatozoides móviles y de sus velocidades en dosis seminales porcinas. Además, el resveratrol tiene un claro efecto deletéreo en el metabolismo del espermatozoide al disminuir el potencial de membrana mitocondrial y disminuir el contenido de ATP de estas células. Finalmente, entre los efectos negativos del resveratrol también debemos destacar la desorganización de las membranas plasmática y acrosomal, la disminución de la respuesta específica al bicarbonato y el aumento de la respuesta específica al calcio (asociado a una pérdida de la homeostasis del calcio) que se produce el día 7 de conservación de las dosis seminales a 17°C.

Una alternativa que consideramos para la mejora de la conservación de los espermatozoides es profundizar en el estudio de la fisiología espermática, en concreto en lo referente a las rutas de señalización intracelular. En este sentido, recientemente nuestro grupo de investigación ha descrito por primera vez la presencia de la proteína AMPK en células germinales masculinas de mamíferos y ha demostrado la importancia de esta proteína tanto en la movilidad, como en el mantenimiento de la organización de las membranas plasmáticas y acrosomal de los espermatozoides porcinos. En la presente tesis doctoral hemos descrito por primera vez que la fosforilación (activación) de la AMPK en el residuo treonina 172 (PThr172-AMPK), se incrementa en función del tiempo de conservación de los

espermatozoides porcinos a 17°C, alcanzando un máximo de actividad el día 7. Este aumento de la actividad podría estar relacionado con la respuesta metabólica del espermatozoide para prevenir situaciones de estrés por enfriamiento. Además, una vez descrito que esta proteína se expresa en espermatozoides porcinos, usamos un inhibidor específico de la proteína AMPK, el compuesto C, obteniendo como resultado una menor estabilidad de la membrana plasmática y un descenso de la motilidad espermática. Estos resultados indican que un correcto funcionamiento de la proteína AMPK es necesario para el mantenimiento de la calidad de las dosis seminales conservadas a 17°C a largo plazo.



One of the most current techniques used in the field of porcine reproduction is the artificial insemination with refrigerated semen. In this technique, spermatozoa have the challenge to preserve their fertilizing capacity during several days. Therefore, ejaculates are diluted for short or long term in commercial extenders to produce seminal doses that later will be preserved at 15-17°C until day of use, which is generally lower than 5 days. The commercial extender is indeed one of the factors influencing the tolerance of spermatozoa to the preservation by refrigeration. Some extenders preserve porcine semen more efficiently than others, and differences between extenders are driven by their composition, as demonstrated in several studies. However, there are few references in the literature regarding the role of male breed in the tolerance of spermatozoa to the preservation in a particular extender. Therefore, in the current Doctoral Thesis we have decided to study the capacity of two widely used extenders, MRA and X-Cell, to preserve seminal doses considering the breed as plausible variation source. The conclusion driven by our study is that the adaptation of each male breed to each extender is different in terms of their objective motility of spermatozoa parameters during the preservation period. Moreover, data show that differences exist between two or more male breeds in the spermatozoa preservation capacity when using a particular extender. Among results, we would like to mention that X-Cell is the extender that renders better progressive motility to spermatozoa from Iberic breed and that the range of differences between breeds could vary with the used extender. Therefore, based on the variability observed among extenders used in a particular porcine breed, we recommend that those studies designed to compare the efficiency of several extenders during spermatozoa preservation, should be performed in just a particular breed.

It is well known that seminal doses time-dependently lose their fertilizing capacity when are preserved at 17°C. This decrease in the fertilizing capacity could be associated to the lipid composition of the boar spermatozoa plasma membrane, which contains a large amount of polyunsaturated fatty acids. This particular lipidic composition of plasma membrane makes boar spermatozoa very susceptible to

oxidation, and therefore several antioxidant substances have been added to seminal doses to improve the diminished sperm quality. For this reason, in the current Doctoral Thesis we proposed as second aim the use of two antioxidant molecules in seminal doses: melatonin (1  $\mu$ M) and resveratrol (10, 33, 66 and 100  $\mu$ M), which had rendered favorable results in the preservation of spermatozoa from other species. However, our data in porcine spermatozoa do not allow us to recommend the use of any of these two antioxidants to improve the preservation of seminal doses during 7 days at a 17°C. Thus, when melatonin was added to seminal doses we observe lower percentage of motile spermatozoa as well as a decrease in both viability, which is maximum at day 7, and spermatozoa velocity. When boar seminal doses were supplemented with resveratrol we observe a lower percentage of motile spermatozoa and decreased velocities. Moreover, resveratrol causes a clear deleterious effect in sperm metabolism by decreasing both mitochondrial membrane potential as well as the ATP content in these germ cells. In addition to these negative effects, resveratrol also causes i) disorganization of plasma membrane, ii) a decreased specific response of spermatozoa to bicarbonate, and iii) an increased specific response to calcium (associated to a loss of calcium homeostasis) at day 7 of seminal doses preservation at 17°C.

An alternative proposal that we have considered to improve the semen preservation process is to gain insight into the study of spermatozoa physiology, focused on intracellular signaling pathways that regulate sperm function. In this area, recently our research team has identified for the first time the AMP-activated protein kinase AMPK in mammalian spermatozoa and demonstrated that contribute to the regulation of several functional processes in boar spermatozoa, such as motility and maintenance of plasma and acrosomal membranes organization. In the present Thesis, we have described for the first time that the AMPK phosphorylation at residue Thr172 (PThr172-AMPK), which indicates activation of the kinase, increases over the time of boar spermatozoa preservation at 17°C, reaching a maximum kinase activity at day 7. This increase in AMPK activity could be related with the spermatozoa metabolic response to prevent those cell stress conditions

caused by cooling. In addition, by using a specific inhibitor of AMPK, compound C, we demonstrate that AMPK inhibition causes a diminished plasma membrane stability as well as lower spermatozoa motility during preservation. Our results indicate that a proper function of AMPK activity is needed to maintain the quality of seminal doses preserved for long term at 17°C.



# **Introducción**





## **EL ESPERMATOZOIDE**

El espermatozoide es una célula haploide que constituye el gameto masculino. Es una de las células más diferenciadas y su función es la formación de un cigoto al fusionarse su núcleo con el del gameto femenino, fenómeno que dará lugar posteriormente al embrión y feto.

### **Espermatogénesis**

La espermatogénesis es el proceso de formación de los gametos masculinos. La espermatogénesis tiene lugar en los túbulos seminíferos. En el cerdo dura alrededor de 40 días (Franca y Cardoso, 1998; Swierstra, 1968) y consta de tres fases:

-fase de espermatocitogénesis: fase de proliferación que consiste en divisiones mitóticas de las espermatogonias. Existen 4 clases de espermatogonias en el cerdo (Frankenhuis y cols., 1982) que se irán sucediendo: espermatogonia indiferenciada tipo A, espermatogonia diferenciada tipo A, espermatogonia intermedia y, en la fase final de la espermatocitogénesis, espermatogonia tipo B. Una parte importante de esta fase de proliferación es la renovación celular.

-fase espermatocitaria (meiótica): en esta segunda fase encontramos espermatoцитos primarios (derivados de las espermatogonias tipo B) y secundarios. Durante esta fase meiótica se asegura la diversidad genética al producirse la replicación del ADN. Desde un punto de vista genético no encontraremos 2 espermatozoides idénticos.

-fase espermiogénica (diferenciación): durante esta fase final no se producen más divisiones. Las espermátidas indiferenciadas y con forma esférica sufren una serie de cambios que darán lugar a un espermatozoide diferenciado que contiene la cabeza (material nuclear), el cuello y el flagelo.

Teniendo en cuenta el número de generaciones de espermatogonias y el hecho de que 2 divisiones meióticas se producen antes de que una espermátida haploide sea formada, de cada 10 espermatogonias tipo A iniciales, sólo se formaran 2 ó 3 espermatozoides. Esto sucede porque se produce una pérdida de células germinales durante la fase espermatocitogénica (de Rooij y Russell, 2000), con el objetivo de que exista finalmente un número óptimo de células germinales que puedan ser mantenidas por las células de Sertoli. Durante la meiosis también se produce apoptosis celular, probablemente relacionado con el daño cromosómico (Franca y cols., 1998; Roosen-Runge, 1973). Una espermatogonia realizará 10 divisiones mitóticas antes de diferenciarse en un espermatocito.

### **Maduración epididimaria**

En los espermatozoides de mamíferos se suceden cambios metabólicos y bioquímicos, como son la condensación nuclear, el desarrollo y formación del acrosoma, la teca perinuclear, la vaina fibrosa y la gota citoplasmática, así como la formación de los distintos componentes de la membrana plasmática. Estas modificaciones comienzan durante el desarrollo de las células germinales y continúan durante su maduración en el epidídimo (Toshimori, 2003). Así, varias moléculas que están involucradas en la reacción acrosómica o en la interacción con la zona pelúcida y la fusión entre el espermatozoide y el óvulo se producen durante la maduración espermática (Yoshinaga y Toshimori, 2003). Estas modificaciones que se producen durante la maduración son necesarias para que el espermatozoide llegue a ser una célula con capacidad fecundante y sea almacenada en la porción distal del epidídimo. La fase final de la diferenciación espermática requiere de la interacción de estas células germinales con el medio extracelular durante su tránsito por el epidídimo (Yoshinaga y Toshimori, 2003). La duración del tránsito de los espermatozoides de verraco por el epidídimo varía entre 9 y 11 días (Franca y cols., 1998; Swierstra, 1968).

El epidídimo, de unos 100 metros de longitud, se divide en tres partes: cabeza, cuerpo y cola. Las funciones del epidídimo son: secreción y absorción de

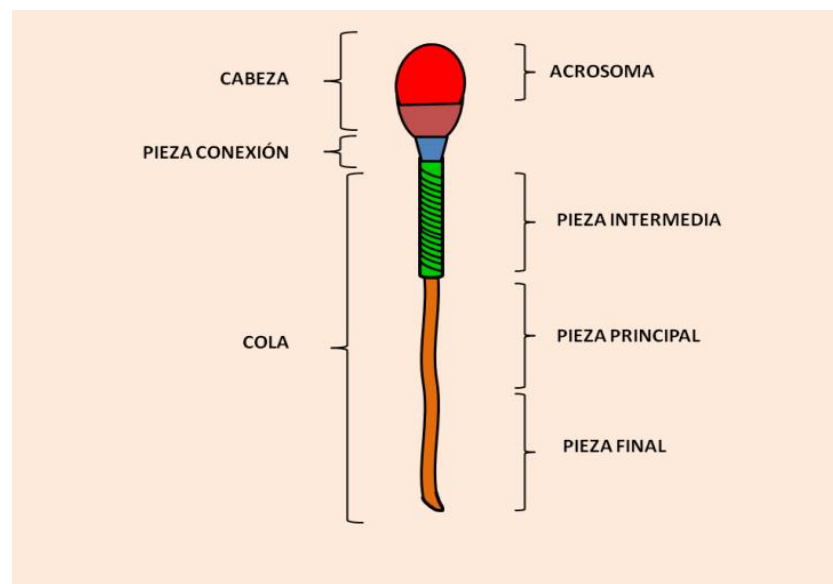
proteínas, endocitosis, actividad secretora responsable de la acidificación del fluido luminal, defensa inmunitaria, fagocitosis y producción de antioxidantes. Entre estos antioxidantes cabe destacar la vitamina E, que participa en una correcta estructura y función de las células epiteliales del epidídimo (Bensoussan y cols., 1998). Por lo tanto el epidídimo está especializado en crear un microambiente responsable del transporte, maduración y almacenamiento de espermatozoides. El tránsito de los espermatozoides por el epidídimo es esencial para una reproducción normal, ya que se ha comprobado que espermatozoides extraídos directamente del testículo no son capaces de fertilizar óvulos.

### **Estructura del espermatozoide**

El espermatozoide maduro de cerdo tiene 45  $\mu\text{m}$  de longitud, y en él se diferencian tres regiones:

1. La cabeza: forma oval y plana. Mide unos 7  $\mu\text{m}$  de longitud por 4  $\mu\text{m}$  de ancho y 0,4  $\mu\text{m}$  de grosor. En la cabeza diferenciamos:
  - a. Acrosoma: una vesícula que se dispone en forma de capuchón sobre el núcleo alcanzando el 80 % de su longitud.
  - b. Lámina densa: supone el 20 % de la cabeza que no está cubierto por el acrosoma y se le conoce como región postacrosómica.
  - c. Espacio subacrosómico: es el espacio existente entre el núcleo y la membrana acrosómica interna.
  - d. El núcleo: contiene la cromatina en estado de elevada condensación.
  - e. Material fibroso perinuclear: se dispone formando una lámina alrededor del núcleo.
2. Cuello o pieza de conexión: mide 0,7  $\mu\text{m}$  de longitud. Su forma es ligeramente cónica, tiene una base ancha en contacto con la cabeza y otra más estrecha en contacto con la pieza intermedia.
3. Cola: responsable de la motilidad espermática. Se diferencian 3 regiones:
  - a. Pieza intermedia, en la que podemos distinguir:

- i. Axonema: ocupa el eje central. Presenta la fórmula microtubular de 9+2 y otros componentes típicos: brazos de dineína, fibras de nexina, radios, puentes y vaina central.
  - ii. Vaina mitocondrial: localizada debajo de la membrana plasmática y formada por varias mitocondrias alargadas, dispuestas helicoidalmente.
  - iii. Fibras densas: estructuras citoesqueléticas y filamentosas que se disponen entre la vaina mitocondrial y cada uno de los microtúbulos periféricos.
- b. Pieza principal:
- i. Vaina fibrosa que sustituye a la vaina mitocondrial.
  - ii. Annulus o anillo de Jensen: es una estructura dispuesta en el límite entre la pieza intermedia y la pieza principal. Tiene forma anular y separa la vaina mitocondrial de la vaina fibrosa.
- c. Pieza terminal: formada únicamente por la membrana plasmática y el axonema.



Esquema de la estructura del espermatozoide

## **BREVE RESEÑA HISTÓRICA DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL PORCINA**

La historia de la inseminación artificial (IA), comienza en el año 1678 cuando Leewenhoek observó por primera vez espermatozoides, a los que llamó animáculos. Tuvo que pasar un siglo desde que se describieron los espermatozoides por primera vez hasta que se llevó a cabo la primera inseminación con éxito en una perra por Spallanzani (1784). Otros 100 años tuvieron que transcurrir hasta que Heape (1897) y otros investigadores empezaron a realizar estudios en conejos, perros y caballos.

Los primeros esfuerzos para establecer la IA artificial en cerdas como un procedimiento práctico y rutinario fueron llevados a cabo en Rusia por Ivanow (Ivanow, 1907; Ivanow, 1922). Investigaciones más extensas fueron llevadas a cabo a partir de los años 30 (Maule, 1962; Milanow, 1938; Nishikawa, 1964). También se realizaron trabajos en Estados Unidos (McKenzie, 1931), en Japón (Ito y cols., 1948; Niwa, 1958), y en el oeste Europeo (Polge, 1956). Pronto los verracos fueron entrenados a montar sobre maniqués (Milanow, 1938; Polge, 1956) y para la recolección de semen de verraco se diseñaron vaginas artificiales que ejercían presión en el glande (Ito y cols., 1948; McKenzie, 1931; Polge, 1956) o bien se usó la técnica de la mano enguantada directamente. Esto supuso una enorme mejora con respecto a los primeros métodos de recolección de semen: esponjas colocadas en la vagina antes de la monta.

Una vez conseguida una aceptable recolección del eyaculado, el siguiente paso en la mejora de la técnica fue el diseño de un medio en el que conservar los espermatozoides sin que perdieran su capacidad fecundante. Investigadores rusos volvieron a ser pioneros en este campo. Diseñaron diluyentes para semen de verraco basados en soluciones de glucosa con tartrato de potasio y sodio o sulfato de sodio y peptona, manteniendo una concentración de electrolitos baja (Anderson, 1945; Maule, 1962; Milanow, 1938; Polge, 1956) y una temperatura de almacenamiento de 7 a 12°C. Sin embargo, Ito y cols., (1948) recomendaron

aumentar la temperatura de almacenamiento entre 15 y 20°C. Cuando se incorporó yema de huevo y leche en la composición de diluyentes diseñados para de semen de toro, estos diluyentes fueron modificados para ser usados con semen de verraco enfriado (Maule, 1962; Niwa, 1958; Polge, 1956).

Aunque los resultados de fertilidad con semen congelado en la especie bovina fueron altos, los porcentajes de fertilidad y el tamaño de la camada obtenidos en hembras de cerdo inseminadas con semen congelado fueron bajos. Johnson y cols., (1981) obtuvieron para el semen congelado un 50% de fertilidad y 7 lechones por camada; además describieron cómo la raza del cerdo influye en la resistencia a la congelación del semen, obteniendo mejores resultados para la raza Dutch Large White que para Dutch Landrace. Aunque la bibliografía sugiere que el semen congelado de cerdo tiene una fertilidad comprendida entre el 50 y el 72% con un número de lechones nacidos entre 7 y 11,7 (Eriksson y cols., 2002; Hofmo y Grevle, 2000; Johnson y cols., 1981), en un trabajo reciente donde se ha evaluado un total de 2.696 inseminaciones con semen congelado a lo largo de 4 años, se han alcanzado un promedio de 78,7% de fertilidad y 12,5 lechones nacidos (Didion y cols., 2013). Si bien es cierto que el primer año de instauración de este sistema en la granja supuso que sólo entre el 50 y el 55% de las cerdas quedaran preñadas. Didion y cols., (2013) hacen hincapié en la necesidad de realizar un periodo de aprendizaje del personal de la granja, que deberá aprender nuevas técnicas de manejo animal e inseminación artificial, además de optimizar todos los protocolos de congelación de semen y control del ciclo estral. Una vez establecidos todos estos protocolos alcanzaron valores de fertilidad del 81,1 % y 85,6% en inseminaciones artificiales realizadas con semen congelado y fresco respectivamente, con un número similar de lechones nacidos  $13,0 \pm 4,0$  con semen congelado y  $13,8 \pm 3,6$  con semen fresco, que nos permite afirmar que con el uso de semen congelado, alcanzan el sitio de fecundación un adecuado número de espermatozoides funcionales.

Otros autores se han interesado en la influencia de la raza en el proceso de criopreservación, concluyendo que existen diferencias entre razas en los parámetros de motilidad y viabilidad espermática tras la descongelación de pajuelas que contenían espermatozoides de cerdo (Hofmo y Grevle, 1999; Kaeoket y cols., 2010; Roca y cols., 2006). Debido a estas diferencias entre razas, se ha propuesto que el protocolo de criopreservación se debería adaptar a las diferencias existentes entre machos o entre razas. Sin embargo, otros trabajos han concluido que la raza no interviene en los resultados de calidad espermática post-descongelación (Holt, 2000; Waterhouse y cols., 2006; Wu y cols., 2013).

Aunque en la actualidad se están obteniendo mejores resultados de fertilidad con el uso del semen congelado, dada la mejora en los protocolos de congelación y en otros aspectos de la técnica, sin embargo, se necesita una mayor especialización del personal y un mejor control del ciclo estral de la cerda. Por ello, y debido a los excelentes resultados obtenidos con la inseminación artificial utilizando dosis seminales conservadas mediante refrigeración, su uso aún está limitado a determinados programas de conservación de razas y bancos de semen para hacer frente a posibles catástrofes naturales o enfermedades. Hoy día, el 99% de las inseminaciones artificiales en cerdas se realiza con semen preservado en diluyentes comerciales en el mismo día de extracción o almacenado hasta 5 días entre 15-20°C. El 85% de las inseminaciones se realizan el mismo día de la extracción de semen o en el día siguiente.

Las ventajas que presenta la inseminación artificial con semen refrigerado frente a la monta natural son:

➤ **Ventajas Zootécnicas:**

- Permite tener un menor número de verracos, con ahorros de espacio y costes de mantenimiento.
- Permite la difusión rápida del potencial genético de los mejores verracos con las características deseadas.
- Permite obtener lotes de lechones más homogéneos.



- Incrementa la velocidad de selección, debido al mayor número de concepciones en menor tiempo.
- Permite controlar la calidad espermática de los machos expuestos a múltiples efectos medioambientales, de manejo y sanitarios.
- Los mejores machos pueden utilizarse más que los que se utilizan para monta natural porque con la IA se aumenta el número de servicios por eyaculado.

➤ **Ventajas Sanitarias:**

- Se reduce el riesgo de transmisión de enfermedades infecto-contagiosas por vía sexual.
- Se reduce la entrada de animales portadores de enfermedades.

➤ **Ventajas de manejo:**

- Facilita el manejo en bandas.
- Elimina los problemas de apareamiento entre animales de distinto tamaño.
- Minimiza los inconvenientes de mantener verracos en instalaciones adecuadas, coste de la alimentación y prácticas sanitarias, etc.

A todas estas ventajas se le añade el que los resultados obtenidos con esta técnica igualan e incluso mejoran los obtenidos en los sistemas de monta natural.

## **INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON SEMEN REFRIGERADO**

Durante la conservación del semen ocurren cambios estructurales y funcionales en los espermatozoides debidos al proceso de envejecimiento natural; sin embargo, diversos factores influyen en la tolerancia del espermatozoide de verraco a la conservación mediante refrigeración, entre los que se encuentran la temperatura y el tiempo de almacenamiento, el tipo de diluyente, la calidad del semen y el grado de dilución.

Es conocido que el espermatozoide de verraco es muy susceptible al enfriamiento. Esto sucede cuando un eyaculado fresco es enfriado rápidamente desde la temperatura corporal a temperaturas por debajo de 15°C, obteniendo como resultado un shock por enfriamiento que desencadena, entre otras cosas, una pérdida de la viabilidad y una pérdida de la motilidad espermática. Sin embargo, si este enfriamiento se hace lentamente, se mejora la resistencia del espermatozoide al mismo. Los cambios que se producen en el espermatozoide que los hace más sensibles al shock por frío no son del todo conocidos. Watson (1996) postuló que el shock por frío podría estar relacionado con la composición lipídica de la membrana, la cual afecta a la fluidez de la misma. Es conocido que la composición de fosfolípidos determina la fase de las membranas. Cuando la temperatura baja, se produce una restricción del movimiento lateral de los fosfolípidos de membrana, pudiendo resultar un cambio de la fase líquida a una fase de gel. Las diferencias observadas en los cambios estructurales inducidos por el frío entre los espermatozoides de toro (resistentes al enfriamiento) y los espermatozoides de verraco (sensibles al enfriamiento) podrían ser explicadas por las diferencias en la composición de la membrana plasmática espermática existentes entre ambas especies. Se ha comprobado que en cerdo existe un porcentaje inferior de fosfatidilcolina y uno mayor de fosfatidil-etanolamina y esfingomielinea, en comparación con los espermatozoides de toros (Watson, 1996).

Otro factor que influye en el comportamiento de los espermatozoides frente al frío es el porcentaje de colesterol de las membranas (Johnson y cols., 2000). La ratio colesterol/fosfolípidos en el espermatozoide de cerdos es muy baj y además el colesterol se distribuye asimétricamente en la bicapa lipídica, estando más presente en la membrana exterior que en la membrana interior de la bicapa. Esta distribución podría hacer a la monocapa interior más susceptible al shock por frío. El enfriamiento produce la reorganización de las moléculas de las membranas, y, aunque es parcialmente reversible, podría modificar la función de la membrana de distintas maneras. Por ejemplo se puede producir un aumento de su permeabilidad (ocasionando la salida de cationes y enzimas), una reducción tanto de la actividad de enzimas, como del proceso de difusión a través de la membrana (De Leeuw y cols., 1990).

Los espermatozoides son diluidos con los fluidos seminales procedentes de las glándulas accesorias en el momento de la eyaculación y su motilidad se mantiene durante unas horas. Para aumentar la supervivencia espermática *in vitro* es necesario, además de la dilución del semen, reducir su actividad metabólica mediante inhibidores químicos o mediante una reducción de la temperatura. Los espermatozoides responden a la dilución con una disminución de la motilidad y un aumento de los daños de membrana (Johnson y cols., 2000). Con una excesiva dilución se produce una disminución significativa de la viabilidad celular. No existe una explicación para este llamado “efecto dilución”, pero ha sido definido como un daño celular que sucede como consecuencia de una pérdida de componentes y/o dilución de los agentes protectores del fluido seminal (Watson, 1955). Una reducción en la concentración de los componentes del plasma seminal podría contribuir a este efecto, que puede ser omitido por la inclusión de albúmina en el medio. El efecto dilución es debido a la ausencia de proteínas estimulantes de la motilidad procedentes del plasma seminal. En este sentido se demostró que la albúmina sérica estimula la motilidad de los espermatozoides de una manera reversible (Harrison y cols., 1982), incluso durante 6 días de conservación (Waberski y cols., 1989). Igualmente, se ha demostrado que el uso de albúmina sérica bovina

(BSA) mejora la fertilidad de cerdas inseminadas con semen conservado durante 3-5 días (Waberski y cols., 1994a). Por otra parte, la adición de  $K^+$  podría contribuir al mantenimiento de la motilidad espermática, ya que es esencial una concentración alta de  $K^+$  en el fluido seminal para mantener la viabilidad celular (Harrison y cols., 1978).

La dilución y el enfriamiento hacen que la membrana plasmática del espermatozoide sea más permeable (Ortman y Rodriguez-Martinez, 1994). Se ha descrito cómo este aumento de la permeabilidad permite la entrada de iones de calcio procedentes del medio, la cual puede inducir la capacitación espermática y aumentar la fusogenicidad de la membrana (Watson, 1996).

Cambios en la fluidez de la membrana lipídica, pueden afectar también al movimiento de  $Ca^{2+}$  a través de la membrana que, aunque esencial para el proceso de capacitación, sin embargo tiene efectos perjudiciales durante la conservación de los espermatozoides.

Como se comentó anteriormente, el diluyente es uno de los factores que influyen en la tolerancia del espermatozoide a la conservación a bajas temperaturas. Existen diferentes factores a tener en cuenta a la hora de formular un diluyente: fuerza iónica, pH, tipo de iones y la presión osmótica del medio. En un eyaculado fresco, el pH varía entre 7,2 y 7,5; por debajo de estos valores la motilidad y el metabolismo espermático se reducen gradualmente. El alto contenido en glucosa presente en la mayoría de los diluyentes de cerdo provoca una disminución del pH intracelular por debajo de 6,0. Esta acidosis permite la supervivencia de los espermatozoides durante varios días a temperatura ambiente (Johnson y cols., 2000). Diversos tampones ayudan a controlar el pH del medio. Existen tampones simples como el bicarbonato y el citrato sódico, que han mostrado tener una limitada capacidad amortiguadora. Existen otros tampones más complejos (TES, Hepes, MOPS, Tris) que pueden controlar el pH bajo en diferentes condiciones y no son dependientes de la temperatura (MOPS y Hepes). El pH de los diluyentes varía de 6,8 a 7,2, pero hay que tener en cuenta que no es estable hasta

pasados 60-90 minutos desde su dilución con agua destilada, mostrando diferentes patrones de cambios de pH a lo largo del tiempo (Johnson y cols., 2000). Cuando se prepara el diluyente se debe medir el pH para evitar efectos negativos durante la conservación. Así, por ejemplo, en un trabajo donde comparan el efecto del pH en espermatozoides de toro diluidos en un mismo medio se comprobó que el pH comprendido entre 7 y 7,5 era el óptimo en base a unos mejores resultados de motilidad, viabilidad y actividad mitocondrial. Además, los valores de pH  $<6,5$  ó  $>8$  fueron descritos como subóptimos, ya que los espermatozoides tenían disminuidas su motilidad y la actividad mitocondrial (Contri y cols., 2013). Por otra parte, cuando se comprobaron dosis seminales de cerdo preservadas con distintos diluyentes comerciales, se observó que el pH de las dosis seminales se incrementó una media de 0,5 al final de los 7 días que duró el experimento, independientemente del pH inicial del medio. Este incremento del pH se ha correlacionado negativamente con la motilidad espermática en cerdos (Vyt y cols., 2004)

El eyaculado de cerdo tiene una presión osmótica de 290-300 mOsm y el espermatozoide puede tolerar un amplio rango de presión osmótica (240-380 mOsm). La fuerza iónica del diluyente no parece ser muy importante para los diluyentes de espermatozoides de verraco, ya que la osmolaridad es mantenida por componentes no iónicos, como la glucosa. Varios investigadores han evaluado la tolerancia del espermatozoide a diferentes valores de presión osmótica, concluyendo que ni la viabilidad ni la motilidad se ven afectadas por presiones osmóticas comprendidas entre 250 y 290 mOsm (Fraser y cols., 2001). Otros investigadores, sin embargo, observaron que medios isotónicos o ligeramente hipertónicos ofrecen una mejor conservación y mejoran la capacidad fecundante del espermatozoide en comparación con medios hipotónicos (Weitze, 1990). Sin embargo, presiones osmóticas por debajo de 200 mOsm disminuyen significativamente la motilidad (Fraser y cols., 2001; Gilmore y cols., 1996). Los nuevos diluyentes están basados en tampones orgánicos zwitteriónicos, especialmente el TES y HEPES (Crabo y cols., 1972; Weitze, 1990), que captan metales pesados y controlan el pH.

La fuerza iónica en un diluyente para semen fresco es proporcionada por el bicarbonato sódico y el citrato sódico y, en ciertos diluyentes, por el cloruro potásico. Uno de los componentes más utilizados es el  $K^+$ , empleado a bajas concentraciones (mínimo 4 mM) para mantener la bomba  $Na^+-K^+$ , prevenir el agotamiento del  $K^+$  intracelular y la pérdida de motilidad (Alvarez y Storey, 1982). El bicarbonato, por otra parte, es conocido por causar cambios en la membrana plasmática que conducen finalmente a la desestabilización de la membrana, un paso importante que ocurre durante capacitación espermática (Harrison y cols., 1996).

El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) tiene propiedades quelantes, capturando metales de iones divalentes, especialmente el  $Ca^{2+}$ , limitando probablemente su movimiento a través de la membrana plasmática y, en el caso del espermatozoide, previniendo así el inicio de la capacitación y la reacción acrosómica.

En la mayoría de los casos, el tejido testicular y las glándulas accesorias del verraco están libres de bacterias. La contaminación bacteriana del eyaculado ocurre durante el proceso de recogida del semen (Fraser y cols., 2001; Johnson y cols., 2000; Martin Rillo y cols., 1998). Por este motivo, y dado que los diluyentes incluyen glucosa entre sus componentes, y debido a que la temperatura de almacenamiento de las dosis seminales (15-17°C) facilita el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram negativas (incluyendo *E.coli*, *Salmonella* y *Pseudomonas*), es necesaria la adición de antibióticos al diluyente. La contaminación bacteriana conlleva una serie de alteraciones que incluyen una disminución de la motilidad espermática, aglutinación espermática y un aumento de la proporción de acrosomas dañados, así como de una acidificación del medio (pH 5,7-6,4) (Althouse y cols., 2000). La adición de una concentración adecuada de antibióticos mejora la supervivencia espermática además de mejorar los resultados de fertilidad [Revisado por (Colenbrander y cols., 1993)]. Inicialmente se usó una mezcla de penicilina y estreptomina (1g/L), para posteriormente ser reemplazadas por aminoglicósidos,

que hoy día se siguen usando con éxito, como son la gentamicina, neomicina y kanamicina (200 mg/L). Más recientemente, están siendo utilizadas nuevas generaciones de antibióticos (ceftiofur, apramicina, etc.), si bien no hay resultados concluyentes sobre la fertilidad de dosis seminales que usen este tipo de antibióticos en la actualidad. La Directiva Europea 909/429/CEE (OJ, 1990) que regula la política de salud aplicada a los intercambios de semen de la especie porcina entre los países miembros, establece la necesidad del uso de combinaciones antibióticas específicas para inhibir el crecimiento de leptospiras y micoplasmas. Las concentraciones deberían al menos tener un efecto equivalente a 500 UI/mL de estreptomicina, 500 UI/mL de penicilina, 150 mg/mL de lincomicina o 300 mg/mL de espectomicina.

Los diluyentes seminales se han clasificado en dos grandes grupos: los de conservación a corto plazo (1-3 días) y aquéllos que tienen como objetivo la conservación del semen a largo plazo (más de 4 días) entre 15-20°C. Estos últimos ofrecen las ventajas de poder transportar las dosis seminales a largas distancias, de su uso en situaciones de excesiva carga de trabajo en el centro de inseminación, de la preparación de dosis seminales a partir de machos poco demandados y de permitir realizar pruebas diagnósticas en el semen antes de ser utilizado.

En la actualidad uno de los diluyentes de corta duración más usado es el BTS (solución de congelación de Beltsville), desarrollado por Pursel y Johnson en 1975 para congelar semen de cerdo y posteriormente adaptado para la conservación en refrigeración (Pursel y cols., 1978) entre 15-20 °C. Este diluyente contiene una concentración baja de potasio con el fin de mantener la concentración intracelular de este ión a niveles fisiológicos durante la conservación. Ensayos de campo con semen diluido en BTS han mostrado unos resultados muy buenos de fertilidad tras la IA de cerdas con semen conservado durante 3 días (Hofmo y cols., 1998).

El primero de los diluyentes de los denominados de larga duración fue el Zorlesco (Gottardi y cols., 1980), que se caracteriza por ser un medio bastante más complejo, con la adición de Tris como regulador del pH, BSA y cisteína en su

composición. Esta cisteína, como otros compuestos con grupos sulfidrilo, permitiría estabilizar las membranas e inhibir el proceso de capacitación (Johnson y cols., 2000). La utilización de este diluyente en condiciones de campo no produjo resultados satisfactorios, en parte debido a desequilibrios en su composición que suponen una presión osmótica final reducida (240 mOsm/L). Posteriormente, Moretti (1981) creó el diluyente Modena, incrementando la proporción de glucosa y eliminando la BSA del medio Zorlesco, pero los resultados de fertilidad obtenidos tampoco fueron satisfactorios (Johnson y cols., 1988).

En España, Santiago Martín Rillo y Eulogio Alías desarrollaron el diluyente de larga duración MR-A (Martin Rillo, 1984), dando muy buenos resultados como diluyente de larga duración. Se ha comprobado que el diluyente MR-A es capaz de mantener la misma tasa de fertilidad realizando inseminaciones con dosis seminales conservadas hasta 5 días (Martinez y cols., 1986). Por el contrario, otros autores han descrito que la fertilidad y el tamaño de la camada van disminuyendo al transcurrir el tiempo de conservación de las dosis seminales (Ratto y Jokinen, 1990).

Wietze (1990) presentó el diluyente Androhep, que se caracteriza por contener HEPES como regulador del pH, BSA para compensar el efecto de dilución de las proteínas del plasma seminal y por presentar una presión ligeramente hipertónica (309 mOsm/L). Este diluyente ha tenido una importante aceptación en el sector porcino como diluyente de larga conservación.

Posteriormente han aparecido nuevos diluyentes de larga duración: Acromax, X-Cell, Androhep Plus, Vital, SpermAid, Mulberry III. Se ha demostrado que la dilución en estos medios conserva la calidad espermática hasta 5 días de forma tan efectiva como el BTS durante 3 días de conservación (Waterhouse y cols., 2004). Un trabajo de comparación realizado entre los diluyentes Androhep y X-Cell muestra resultados similares de fertilidad entre los dos diluyentes durante los 5 días de conservación (Kuster y Althouse, 1999). Sin embargo el diluyente Androhep se ha asociado con una reducción de la fertilidad el sexto día de conservación y con



reducción del tamaño de la camada cuando se usan dosis seminales el quinto día de conservación (Kuster y Althouse, 1999).

En un laborioso trabajo en el que se comparan 9 diluyentes comerciales usados en la producción de dosis seminales porcinas y en el que se usaron eyaculados de verracos procedentes de un cruce comercial Yorkshire x Landrace, se aprecia que entre los diluyentes existen diferencias pequeñas, pero significativas, al comparar los distintos parámetros de motilidad observados (porcentaje de mótils, porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, velocidades e índices de linealidad). Así, por ejemplo, si comparamos dos diluyentes comerciales de larga duración entre sí, MR-A y X-Cell, los valores de las velocidades, porcentaje de espermatozoides mótils y mótils progresivos siempre son mayores, aunque sin llegar a ser estadísticamente significativos con el diluyente MR-A durante los 7 días que dura el estudio. Sin embargo, los valores de linealidad (LIN y STR) son significativamente mayores con el diluyente X-Cell en cualquiera de los días observados (Estienne y cols., 2007). En otro trabajo en el que comparan un diluyente de corta duración, BTS, y dos diluyentes de larga duración, MR-A y X-Cell, se ha descrito que no existen diferencias significativas entre estos diluyentes en su capacidad para preservar la viabilidad, motilidad o la estabilidad de la cromatina de espermatozoides procedentes de machos fértiles durante 96 horas de conservación a 17°C (De Ambrogi M. y cols., 2006).

Diversos estudios han analizado el efecto de la duración del almacenamiento seminal con diferentes diluyentes en la fertilidad de las cerdas inseminadas. Al comparar diluyentes de corta frente a diluyentes de larga duración, en general no se observaron diferencias ni en fertilidad ni en prolificidad los primeros 3-4 días de conservación. Estos resultados se obtuvieron al comparar Kiev y MR-A (Ratto y Jokinen, 1990) y BTS y MR-A (Hofmo y cols., 1998; Johnson y cols., 1988).

Sin embargo, Conejo-Nava y cols., (2003) utilizando semen conservado más de 5 días a 15-18°C para IA observaron una disminución de la tasa de partos y del tamaño de la camada de cerdas tras la IA, a pesar de las altas tasas de motilidad

progresiva de los espermatozoides. A los 4 días de conservación se produjo un incremento en el porcentaje de espermatozoides que habían sufrido reacción acrosómica, por lo que atribuyeron a este fenómeno la disminución de la capacidad fecundante del semen almacenado a 16°C durante más de 4 días.

De esta forma, la elección del diluyente se realiza dependiendo del tiempo de conservación de las muestras seminales. Así para menos de 3 días, de acuerdo con lo dicho anteriormente, no se observan diferencias en la calidad seminal ni en la fertilidad resultante entre diluyentes de corta y larga duración, por lo que se puede optar por un diluyente de corta duración (tipo BTS o Kiev) con unos costes menores y unos resultados, como hemos mencionado con anterioridad, equivalentes a los de los diluyentes de larga duración. Para más de 4 días se deben utilizar diluyentes de larga duración, si bien conviene aumentar la concentración de espermatozoides en la dosis seminal para compensar las pérdidas por envejecimiento de los espermatozoides.

Por último, un aspecto que no es tenido en cuenta en la aplicación de un diluyente es que no todos los machos interaccionan de la misma manera con el diluyente. Se han descrito variaciones entre machos en la tolerancia a la conservación *in vitro* de muestras seminales (Conlon y Kennedy, 1978; Kommisrud y cols., 2002; Waterhouse y cols., 2004), proponiéndose que los diluyentes también necesitan ser adaptados a las diferencias individuales existentes entre machos (Gadea, 2003; Lewis, 2013). Por otro lado, gran parte de los estudios existentes que comparan distintos diluyentes usan varias razas, razas híbridas o incluso la raza del verraco no es especificada. Aunque se han descrito diferencias entre razas en la calidad seminal (Ciereszko y cols., 2000; Conlon y Kennedy, 1978; Gadea, 2003; Kennedy y Wilkins, 1984; Smital, 2009; Sonderman y Luebbe, 2008), en general, los estudios que comparan distintos diluyentes no consideran la raza del verraco como una posible fuente de variación en la capacidad de los diferentes diluyentes para preservar la calidad espermática durante la conservación, de tal forma que los

resultados de diferentes estudios podrían no ser comparables o los valores medios podrían no ser representativos de la población.

## **EFFECTOS DE LA CONSERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES**

Como hemos comentado anteriormente, el uso de semen porcino refrigerado implica la conservación de las dosis seminales a 15-20°C durante 1-5 días antes de la IA. Se ha demostrado que existe una pérdida de fertilidad si la IA se realiza después de 12-24 horas desde que se produjo la ovulación (Soede y cols., 1995; Waberski y cols., 1994b). En un estudio de campo en el que se realizaron 41.327 inseminaciones artificiales utilizando semen diluido con MR-A con una concentración de  $2.5 \times 10^9$  espermatozoides/dosis, la tasa de concepción y el tamaño de la camada disminuyeron progresivamente con el tiempo de conservación desde el día 1 (día de la recogida del semen) al día 5. La tasa de concepción disminuyó desde el 85,6% al 80,4% y el tamaño de camada de 11,9 a 10,8 cerdos (Ratto y Jokinen, 1990).

El diluyente no es capaz de prevenir totalmente los cambios que acontecen en el espermatozoide y que afectan a su funcionalidad. Así, el semen diluido refrigerado y conservado varios días muestra cambios morfo-funcionales similares a los del proceso de envejecimiento natural y la intensidad de este proceso puede estar influenciada por las condiciones y el periodo de conservación (Rath y cols., 2009). Durante la conservación, el espermatozoide porcino experimenta cambios como son la disminución de la movilidad, viabilidad, actividad mitocondrial y alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática (Huo y cols., 2002). La reducción de la motilidad que se produce durante la conservación espermática ha sido usada como parámetro para predecir la pérdida de la capacidad fecundante del espermatozoide. La pérdida de adenosín trifosfato (ATP) y adenosín monofosfato cíclico (AMPc), así como la reducción de la entrada de calcio, van acompañados de una pérdida de la motilidad (Johnson y cols., 2000). Un indicador importante es el daño de la membrana plasmática que se manifiesta con un aumento de la permeabilidad de ciertos colorantes y la liberación de sustancias intracelulares. En relación a estos cambios de permeabilidad debemos realizar una distinción entre la membrana acrosómica y la membrana plasmática. En el semen conservado durante

4-8 días aumenta la proporción de espermatozoides capacitados y con acrosoma reaccionado (Conejo-Nava y cols., 2003).

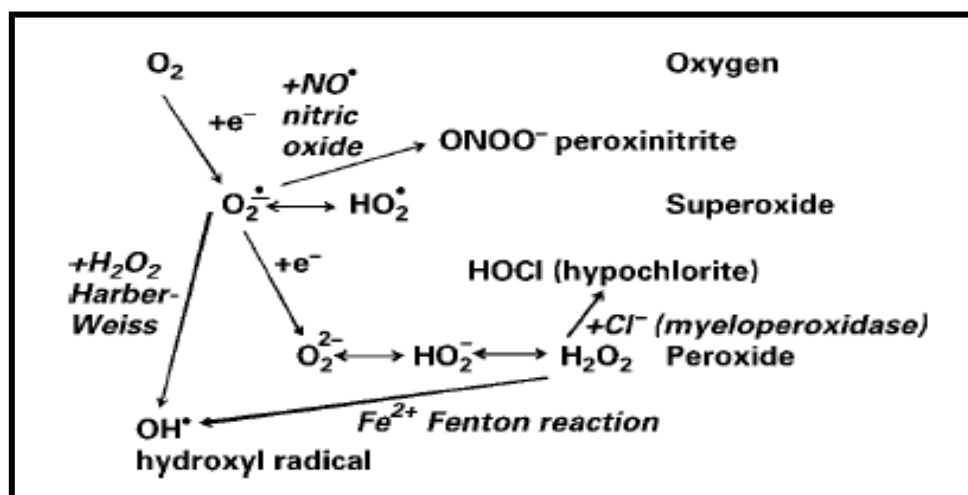
Los mecanismos moleculares responsables del deterioro espermático durante la conservación *in vitro* no son del todo conocidos. En los últimos años ha habido un interés cada vez más creciente en el papel de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en las funciones espermáticas y en la capacidad fecundante durante la conservación. La conservación de los espermatozoides (tanto durante la conservación en refrigeración a largo plazo como en la congelación) produce estrés oxidativo. Debido al alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados de la membrana plasmática del espermatozoide de cerdo, la fase lipídica de la membrana puede ser dañada. Estos cambios de la membrana pueden estar equilibrados por el efecto protector de los antioxidantes seminales como la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPx) [Revisado por (Johnson y cols., 2000)].

## ESTRÉS OXIDATIVO DURANTE LA CONSERVACIÓN DEL SEMEN

Chihuaílaf y cols., (2002), Venéreo (2002) y Olgún y cols., (2004) definieron el estrés oxidativo como un desequilibrio bioquímico ocasionado por la producción excesiva de radicales libres, los cuales exceden la capacidad antioxidante de un organismo o por una disminución en la respuesta homeostática de las células o tejidos, provocando daño oxidativo a las biomoléculas.

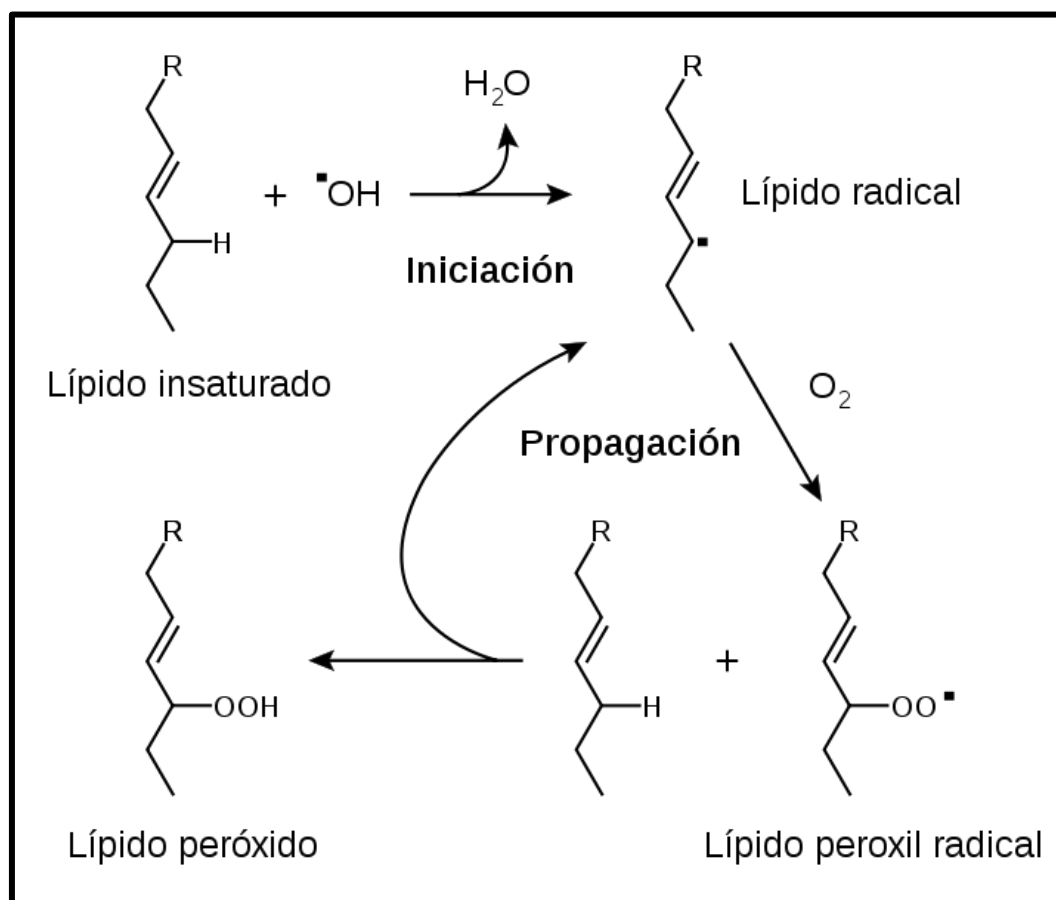
El estrés oxidativo de los espermatozoides se refiere al daño que pueden sufrir en la integridad de sus componentes estructurales y fisiológicos provocado por la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) o moléculas que contienen radicales libres.

Las principales ROS que se conocen y que tienen relación con la funcionalidad espermática son: anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ , precursor del radical hidroxilo) y la mayoría de radicales hidroxilos ( $-OH$ ), cuya presencia en el ambiente espermático se relaciona con el aumento de espermatozoides muertos.



Esquema de la formación de ROS a partir de oxígeno (Ford, 2004)

Un estado de estrés oxidativo induce en la célula efectos perjudiciales por la oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y nucleótidos, lo cual provoca acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, citotoxicidad y apoptosis (Hicks y cols., 2006). Los espermatozoides son muy susceptibles al estrés oxidativo y particularmente a la peroxidación lipídica (LOP) debido a su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en la membrana plasmática (Venéreo, 2002). Los productos finales de la LOP son lípidos peroxidados que, al degradarse, originan nuevos radicales libres y una amplia variedad de compuestos citotóxicos, como los aldehídos, entre ellos 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) y malondialdehído (MDA). Cuando se produce la LPO se pierde el 60% de los ácidos grasos de membrana (Jones y cols., 1979), lo que conlleva a la pérdida de la integridad de ésta, alterándose la cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica de la membrana, produciéndose finalmente la muerte celular.



Esquema del proceso de peroxidación lipídica

El espermatozoide porcino contiene fosfolipasa (PL) A2 (Dyck y Buhr, 1994) que, al aumentar su actividad extra o intracelular, por la acción de la peroxidación lipídica y el calcio en los fosfolípidos de membrana, altera la estructura de la misma e inicia su degradación (Robertson y cols., 1990). La lisis celular y la muerte celular podría deberse a una excesiva actividad enzimática (Shier, 1979).

La medición de la formación de MDA, un producto de degradación de la oxidación del ácido araquidónico (Spiteller, 2006a) proporciona una estimación de la peroxidación lipídica en una población de células (Storey, 1997). La producción de MDA refleja la peroxidación de los fosfolípidos poliinsaturados, los principales componentes de la membrana de los espermatozoides (Cummins y cols., 1994).

En un estudio realizado por Kumaresan y cols., (2009) los niveles de peroxidación lipídica en el espermatozoide conservado a 18° C se midieron basándose en la producción de MDA a diferentes intervalos de tiempo hasta las 96 h de conservación. En este estudio es claramente visible la importancia de la peroxidación lipídica durante la conservación de espermatozoides porcinos refrigerados, pues los niveles de MDA se incrementaron significativamente durante la conservación (Kumaresan y cols., 2009), siendo 9 veces mayores que los que existen al inicio, en el semen diluido sin refrigerar. Estos niveles coinciden con los establecidos en semen porcino crioconservado. Asimismo la motilidad espermática a las 96 horas fue el 50% de la motilidad inicial.

El alto contenido de PUFAs en las membranas plasmáticas de los espermatozoides y el pequeño volumen del citoplasma facilita la producción de ROS, las cuales perjudican su actividad funcional provocando una disminución de la motilidad y viabilidad, y una pérdida en la capacidad de fusión espermatozoide-óvulo (Saez y cols., 1998). Estos resultados fueron confirmados en otros trabajos en los que se demuestra que las ROS inducen la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados esterificados en los fosfolípidos de membrana, lo cual produce un aumento de la permeabilización de la membrana plasmática y acrosomal.



Las proteínas también constituyen una diana para las ROS, pero en éstas la acción de ROS es más lenta que en el caso de los lípidos, debido al lento progreso de las reacciones. Las ROS causan la oxidación de residuos de los aminoácidos, la rotura de los enlaces peptídicos y la agregación entre proteínas (Cárdenas y Pedraza, 2006). El daño oxidativo a las proteínas puede causar la pérdida de su actividad catalítica, daños en la integridad de proteínas estructurales o interrumpir la regulación de las vías metabólicas.

El ADN también constituye una diana de las ROS, principalmente el ADN mitocondrial (Said y cols., 2005; Venéreo, 2002). Este ADN, por su localización, se encuentra expuesto a un flujo constante y elevado de ROS procedente de la cadena respiratoria y además, carece de histonas en su estructura, lo que le resta estabilidad.

Se ha sugerido que las mitocondrias son el principal lugar de formación intracelular de ROS, lo que da lugar a una interrupción del transporte de electrones. En condiciones fisiológicas, el acoplamiento del transporte de electrones a la fosforilación oxidativa mantiene un alto potencial en la membrana interna mitocondrial (MMP), necesario para la producción de ATP mitocondrial en células somáticas (Kramer y Knaff, 1990). La maquinaria metabólica de los espermatozoides está principalmente dedicada a la producción de ATP para ser utilizado en el trabajo de motilidad de los microtúbulos que forman el flagelo espermático. Concretamente, el ATP producido es posteriormente utilizado como sustrato de la ATPasa situada en los brazos de dineína, para convertir la energía química en trabajo mecánico, por la acción de las proteínas contráctiles del flagelo. En este sentido, se ha indicado que únicamente pequeñas cantidades de ATP son consumidas en otras funciones espermáticas, como las relacionadas con el proceso de fecundación (Castillo y cols., 2001). La consecuencia funcional de un daño en las mitocondrias, es una disminución en la producción de ATP, que consecuentemente provoca una pérdida de la motilidad del espermatozoide (de Lamirande y Gagnon, 1992; Gravance y cols., 2000; Halliwell y Gutteridge, 1999).

En 1943 John MacLeod observó que el espermatozoide incubado en altas tensiones de oxígeno pierde rápidamente su motilidad. MacLeod sugirió que esta pérdida de la motilidad se debía a la producción intracelular de  $H_2O_2$ , ya que con la adición de catalasa en las mismas condiciones, los espermatozoides recuperaban su motilidad. Estos datos fueron posteriormente corroborados por otros investigadores (Aitken y cols., 1993; de Lamirande y Gagnon, 1993; Oehninger y cols., 1995), y adicionalmente, se demostró que la pérdida de motilidad de los espermatozoides inducida por ROS se debe a un déficit de ATP, y a una disminución del potencial de membrana mitocondrial (Armstrong y cols., 1999; de Lamirande y Gagnon, 1992).

Más recientemente, en el estudio realizado por Kadirvel y cols., (2009) se observó que los niveles de ROS intracelular estaban fuertemente asociados con la motilidad espermática, LPO y MMP en el semen de búfalo durante su conservación en refrigeración, no existiendo ninguna asociación en espermatozoides congelados y posteriormente descongelados. En este estudio, la motilidad espermática se correlacionó positivamente con el potencial de membrana mitocondrial y negativamente con los niveles espermáticos de ROS durante la conservación mediante refrigeración (Kadirvel y cols., 2009). Resultados similares han sido observados en caballo (Gravance et al., 2000), hombre (Wang et al., 2003) y cerdo (Guthrie and Welch, 2006).

En definitiva, dentro de los mecanismos de acción del estrés oxidativo en el espermatozoide podrían mencionarse el desacoplamiento del transporte de electrones y la disminución de la eficiencia de la fosforilación oxidativa, con la consecuente reducción del número de espermatozoides con potencial mitocondrial suficientemente alto para la producción del ATP necesario para la motilidad espermática.

Por otro lado, hay que mencionar también que, paradójicamente, los espermatozoides requieren una ligera producción intracelular de anión superóxido ( $O_2^-$ ) para el desarrollo de sus funciones. Las ROS son productos del metabolismo

celular y tienen un papel funcional en muchos tipos celulares como segundos mensajeros. Cuando las ROS son producidas a muy baja concentración, desencadena una serie de eventos de señalización celular y regulan funciones fisiológicas (Froman y Feltmann, 2010; Tremellen, 2008).

## **EFFECTO DE ANTIOXIDANTES AÑADIDOS AL SEMEN**

Todas las células aeróbicas poseen sustratos y enzimas para neutralizar las especies reactivas de oxígeno potencialmente tóxicas. Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, los espermatozoides son muy susceptibles al estrés oxidativo (Jones y Mann, 1977) y, aunque están equipados con sistemas antioxidantes para contrarrestar los efectos tóxicos de las ROS, sus defensas antioxidantes son relativamente débiles.

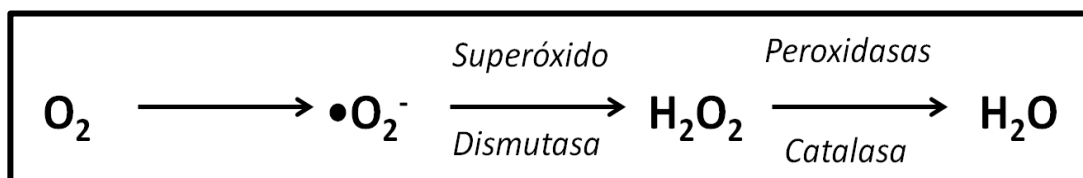
Chihuilaf y cols., (2002) y Membrillo y cols., (2003) definieron los antioxidantes como moléculas que previenen la formación descontrolada de radicales libres o inhiben sus reacciones. La función de un antioxidante, según Hicks y cols., (2006) es actuar como un donador de electrones, capaz de evitar una reacción en cadena de óxido-reducción o, como indicó Venéreo (2002), sacrifica su propia integridad molecular para así evitar alteraciones de moléculas como lípidos, proteínas, ADN, entre otras, funcionalmente vitales.

Entre los antioxidantes naturales se distinguen los antioxidantes enzimáticos y los antioxidantes no enzimáticos. El grupo de antioxidantes enzimáticos catalizan la transferencia de electrones desde un sustrato hacia los radicales libres. Posteriormente, los sustratos o agentes reductores empleados en estas reacciones se regeneran para ser nuevamente activos mediante la acción de enzimas que utilizan como poder reductor el fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADPH) producido en diferentes vías metabólicas, como la de las pentosas fosfato en el paso catalizado por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD).

Los espermatozoides del epidídimo están protegidos por cinco enzimas con acción antioxidante: glutatión peroxidasa (GPx), fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa (PHGPx), glutatión reductasa (GR), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) (Membrillo y cols., 2003). Las más implicadas en el daño por ROS son tres: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y el sistema glutatión

peroxidasa/reductasa (Alvarez y cols., 1987; Griveau y cols., 1995; Jeulin y cols., 1989). La contribución de cada sistema enzimático es diferente entre las especies y se cree que actúan de manera sinérgica.

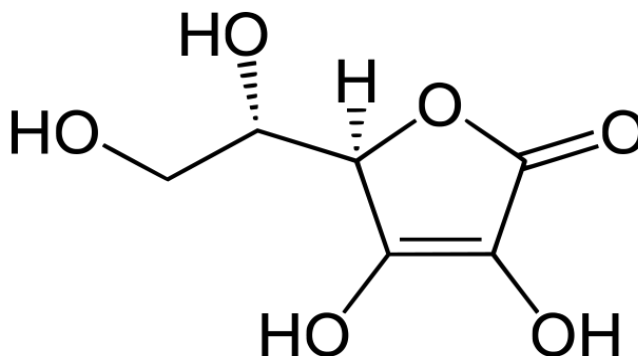
Un estudio sobre las actividades de las enzimas antioxidantes SOD, GPx y la G6PD en espermatozoides y plasma seminal de toros y búfalos, muestra un patrón similar de cambio en ambas especies durante el almacenamiento a temperatura de refrigeración (Nair y cols., 2006). La actividad enzimática en los espermatozoides disminuyó progresivamente a lo largo de 72 horas pero fue aumentando en el plasma seminal. Esto podría ser consecuencia de los daños en la membrana de los espermatozoides provocados por la LPO en la membrana de los espermatozoides. El daño en la membrana provoca que las enzimas de los espermatozoides se viertan hacia el plasma seminal, lo que conduce a un aumento de la actividad de estas enzimas antioxidantes en el plasma seminal. Las actividades de la SOD, GPx y G6PD en los espermatozoides de toro y búfalo se correlacionan positivamente con la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides (Nair y cols., 2006); además la actividad de la enzima SOD con la motilidad de espermatozoides humanos (Alvarez y cols., 1987; Kobayashi y cols., 2003). En estudios anteriores se ha demostrado que la adición de SOD, CAT y GPx tienen efectos positivos en el mantenimiento de la motilidad de los espermatozoides de carnero conservados en refrigeración (Maxwell y Stojanov, 1996). Esta mejora de la motilidad de los espermatozoides ha sido observada en espermatozoides de toro y de carnero tras la adición al diluyente de antioxidantes como la CAT (Shannon y Curson, 1982), GPx (Pomares y cols., 1994) y una mezcla de SOD y CAT (Stojanov y cols., 1994).



Esquema de la ruta enzimática para la detoxificación de ROS

Los principales antioxidantes no enzimáticos son la vitamina A, la vitamina C, la vitamina E y el glutatión. En diversos estudios, como veremos a continuación, la suplementación del diluyente seminal con moléculas antioxidantes consigue reducir el impacto del estrés oxidativo durante el periodo de conservación y, por tanto, mejora la calidad del semen refrigerado.

La vitamina C, es una molécula hidrosoluble y es el antioxidante más importante en los líquidos extracelulares. Se encuentra bajo la forma de ascorbato, distribuido tanto intra como extracelularmente.



Reacciona de forma directa con los radicales libres superóxido, hidroxilo y varios hidroperóxidos lipídicos (Chihuailaf y cols., 2002). En los espermatozoides, la vitamina C protege contra el daño oxidativo al ADN y proteínas y contra la peroxidación a los lípidos (Membrillo y cols., 2003). Se ha demostrado que el ácido ascórbico tiene efectos protectores cuando se añade a un diluyente. Así, Beconi y cols., (1993) indicaron que la presencia de 5mM de ácido ascórbico en el diluyente de congelación ejerce un efecto antioxidante durante la congelación y descongelación del espermatozoide bovino. En espermatozoides humanos se añadió ácido ascórbico a una concentración final de 10 mM al medio de criopreservación, y se observó una disminución del daño en el ADN espermático, aunque solamente en hombres infértiles, no encontrándose ningún efecto en hombres fértiles (Branco y cols., 2010). En el estudio realizado por Hu y cols., (2010), en el que se comparan la adición de distintas concentraciones de ácido ascórbico en un medio crioprotector en espermatozoides de la especie bovina, se observó que, dependiendo de las concentraciones de ácido ascórbico usadas, se obtenían efectos tanto positivos como negativos. Una concentración de 4,5 mg/mL aumenta los parámetros de motilidad de los espermatozoides con respecto a las otras concentraciones estudiadas y además suprime el efecto de las ROS en los espermatozoides bovinos.

Un incremento en la concentración de ácido ascórbico (hasta 8,5 mg/mL) provoca una disminución significativa del movimiento de los espermatozoides comparada con las otras concentraciones usadas. El porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto y la membrana plasmática intacta aumenta significativamente con 4,5 mg/mL de ácido ascórbico, pero disminuye cuando la concentración de ácido ascórbico es de 6,5 mg/mL. Este estudio concluye que la adición de ácido ascórbico a un medio crioprotector eleva efectivamente los niveles de CAT y GSH, no mejora la actividad SOD y disminuye la actividad de GPx (Hu y cols., 2010).

El nombre genérico de la vitamina E hace referencia a sus ocho isómeros estructurales de tocoferol. El  $\alpha$ -tocoferol es una vitamina liposoluble, principal antioxidante en las membranas celulares. Unido a la porción hidrofóbica del  $\alpha$ -tocoferol existe un grupo OH, cuyo H puede eliminarse fácilmente y funcionar como donador de electrones. La vitamina E captura radicales libres superóxido, hidroxilo y peróxidos lipídicos en las membranas celulares y subcelulares (mitocondria y retículo endoplásmico liso) y detiene la propagación de la lipoperoxidación. Esta vitamina es el principal componente del sistema antioxidante de los espermatozoides y es uno de los mejores protectores de las membranas contra ROS y LPO (Yousef y cols., 2003). Así, la vitamina E previene el daño oxidativo en semen bovino criopreservado (Beconi y cols., 1993), así como en el semen de cerdo conservado a 19 °C (Cerolini y cols., 2000). La adición de vitamina E (1-4mM) a semen equino no altera significativamente el mantenimiento de la motilidad de los espermatozoides durante el almacenamiento a 5° C (Ball y cols., 2001). Sin embargo, provoca efectos adversos en la motilidad de los espermatozoides de carnero almacenados a 15°C (Upreti y cols., 1997).



La suplementación del medio de congelación con vitamina E (2mM) añadida a semen crioconservado de toro reduce la producción de MDA después de 4 a 6 horas de incubación (Verma y Kanwar, 1999); resultados similares se han descrito en humanos (Agarwal y cols., 2004). Por otra parte, la suplementación del medio de congelación con la vitamina E mejora la motilidad de los espermatozoides de humanos (Askari y cols., 1994) y de conejos (Yousef y cols., 2003). En un trabajo donde se estudió la adición de  $\alpha$ -tocoferol a semen porcino para su crioconservación, se observó un aumento significativamente de la motilidad durante las primeras 2 h de incubación (Breininger y cols., 2005). Esta mejora de la motilidad en las muestras congeladas podría explicarse por el menor efecto perjudicial de las ROS en las membranas de los espermatozoides debido a la capacidad antioxidante del alfa-tocoferol. El aumento de espermatozoides móviles presentes en las muestras descongeladas con alfa-tocoferol incrementaría la capacidad de fecundación de los espermatozoides descongelados.

Por otro lado, en un estudio donde se analizó la expresión de proteínas proapoptóticas y anti-apoptóticas en semen porcino crioconservado con  $\alpha$ -tocoferol, se comprobó que la expresión de proteínas anti-apoptóticas es más alta en el grupo de espermatozoides a los que se añadió  $\alpha$ -tocoferol, lo que sugiere que en presencia de  $\alpha$ -tocoferol se mejoran los mecanismos de bloqueo de la apoptosis y se confiere resistencia a la criopreservación (Jeong y cols., 2009).

La vitamina E también se ha empleado como suplemento dietético con el fin de investigar sus efectos en las propiedades seminales. La administración oral de vitamina E en perros disminuyó los efectos negativos del estrés en la calidad seminal, inducido con el tratamiento con dexametasona (Hatamoto y cols., 2006) y en humanos también mejoró la función espermática (Kessopoulou y cols., 1995). Se ha demostrado que la alimentación de verracos con complementos de vitamina E mejora el volumen del eyaculado y la concentración de espermatozoides (Brezezinska-Slebozinska y cols., 1995).



Membrillo y cols., (2003) indicaron que el glutatión reducido, tripéptido ( $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina) que atrapa las ROS, es un agente antioxidante que está presente en el ambiente que rodea al espermatozoide. Sus propiedades químicas le permiten actuar frente a numerosos compuestos oxidantes, tales como peróxido de hidrógeno, superóxido, hidroxilo y especies reactivas del carbono; además, reduce el radical libre tocoferoxilo y dihidroascorbato y los reconvierte a su forma original (Chihuailaf y cols., 2002; Olguín y cols., 2004). Tanto la cisteína y como la N-acetilcisteína son precursores de la biosíntesis de glutatión (Meister y Tate, 1976). En un estudio se comprobó los efectos beneficiosos de la suplementación con glutatión o cisteína (5 mM) a espermatozoides de cerdo, ya que se mejoró la viabilidad y la integridad funcional de los espermatozoides durante la conservación a 10°C al menos durante 14 días (Funahashi y Sano, 2005).

Los antioxidantes sintéticos fueron desarrollados a partir de la necesidad de obtener una protección más efectiva y, al mismo tiempo, más económica que los antioxidantes naturales. Entre los antioxidantes sintéticos, cuatro de ellos son los más utilizados en la industria alimenticia y actualmente también en la conservación espermática: BHT, BHA, galato de propilo y TBHQ (Viera, 2004).

El BHT (butil hidroxitolueno–INS 321), debe utilizarse generalmente en conjunto con otro antioxidante para que su efecto se refuerce. El BHT en espermatozoides de pavo permite conservar la integridad de la membrana, la motilidad y la supervivencia espermática durante la conservación a bajas temperaturas (Donoghue y Donoghue, 1997). También se ha indicado que el BHA (butil hidroxianisol – INS 320) ayuda a preservar la motilidad de espermatozoides de carnero conservados a 15°C (Upreti y cols., 1997).

El galato de propilo (INS 310), muchas veces se utiliza en conjunto con el BHT y el BHA para reforzar la actividad de estos últimos.

Upreti y cols., (1997) indicaron que, al igual que el BHA, el n-propil galato tiene la habilidad de preservar la motilidad de espermatozoides de carnero

conservados a 15 °C, aunque la elección del diluyente puede anular los efectos beneficiosos de estos.

El TBHQ (terc-butilhidroquinona – INS 319), cuando se administró oralmente en ratas mejoró la concentración y motilidad espermática (Abdel-Wahab, 2003). Además, cuando se administró junto a dibromo acetoneitrilo, redujo la acumulación de MDA en los testículos.

## **EFFECTO DE LA DILUCIÓN EN LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL PORCINA CON SEMEN REFRIGERADO**

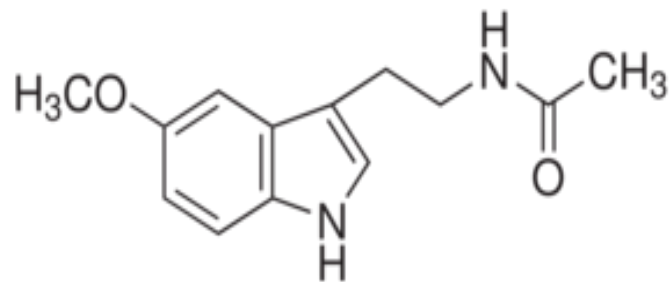
Una de las posibles causas del shock por frío en los espermatozoides, es el efecto dilución, ya que, como se ha mencionado anteriormente, al preparar dosis seminales a partir de un eyaculado, las proteínas y los antioxidantes del plasma seminal son diluidos en un medio acuoso. El efecto lavado que provocan los diluyentes puede modificar la membrana plasmática de los espermatozoides. Además, la manipulación espermática que se produce durante la elaboración de las dosis seminales da lugar a procesos de capacitación que normalmente ocurren en el tracto reproductivo de la hembra (Holt y Fazeli, 2010).

Debido a los problemas que presenta la conservación de dosis seminales de porcino, se han desarrollado nuevas técnicas y aditivos para los diluyentes seminales que intentan mejorar la eficacia reproductiva de las dosis seminales. Así por ejemplo, se han encapsulado espermatozoides en una membrana semipermeable de poli-L-lisina (Nebel y cols., 1985). Esta microencapsulación se lleva a cabo en un solo paso y las cápsulas resultantes tienen una alta concentración de espermatozoides (Vigo y cols., 2009). Los espermatozoides son viables porque las microcápsulas están compuestas de membrana semipermeables que permiten el intercambio de nutrientes y metabolitos con el medio en el que ellos están inmersos. Las microcápsulas permiten la liberación gradual de los espermatozoides durante horas o incluso días en el tracto reproductivo femenino, evitando la preocupación de realizar la inseminación artificial en un periodo de tiempo cercano a la ovulación. Se ha demostrado en condiciones *in vitro*, que espermatozoides de cerdo encapsulados en microcápsulas de alginato de bario, son liberados lentamente durante un período de 24 horas y que los espermatozoides liberados mantienen su potencial fertilizante (Faustini y cols., 2004; Torre y cols., 2002). Vigo y cols., (2009) en un ensayo de fertilidad donde compararon los resultados de una sola inseminación, llevado a cabo con espermatozoides encapsulados con alginato de bario, frente a 2 ó 3 inseminaciones con semen sin encapsular, no obtuvieron

una disminución en el número de lechones nacidos, pero obtuvieron una mejora en los resultados de preñez en aquellas cerdas inseminadas con semen encapsulado.

## MELATONINA Y SUS PROPIEDADES PROTECTORAS

La melatonina, o N-acetil-5-metoxitriptamina, es una hormona sintetizada por los pinealocitos a partir del neurotransmisor serotonina.



La serotonina (5'-

hidroxitriptamina) alcanza sus mayores concentraciones en la glándula pineal. Los mayores picos de secreción se originan en la oscuridad y los menores en las horas de luz. Esto es debido a que el paso limitante de la síntesis de melatonina es la enzima NAT (N-acetil transferasa). Esta enzima, encargada de convertir la serotonina a N-acetil serotonina, tiene menor actividad por el día y mayor por la noche. La hidroxil-indol metil transferasa (HOMT) termina el ciclo con la síntesis de melatonina. Una vez que se estimula, el pinealocito secreta melatonina a la sangre, donde se transporta unida a albúmina (65%) o bien en estado libre (35%).

Desde que se informó que el desarrollo de un tumor en la glándula pineal humana alteraba el desarrollo puberal (casi 70 años antes de la identificación de la melatonina) (Huebner, 1898), ya se sugirió que algún factor de origen pineal podía ser capaz de influir en la función reproductora. Esto llevó a muchos científicos en la primera mitad del siglo XX a estudiar la asociación de la glándula pineal con el estado reproductivo en una variedad de especies, pero con un éxito limitado para demostrar una relación funcional (Kitay, 1954; Thieblot y Bars, 1955). En el año 1958 el dermatólogo y bioquímico estadounidense Aaron Lerner aisló este factor de los extractos biológicos de las glándulas pineales de 250.000 ovejas y lo llamó melatonina. Este descubrimiento de la melatonina abrió un nuevo campo de investigación en la fisiología reproductiva (Lerner y cols., 1958).

La melatonina modula una cantidad diversa de procesos fisiológicos incluyendo el ciclo circadiano (Reiter, 1991), el control de la temporada

reproductiva (Reiter, 1980), la fisiología retiniana (Dubocovich y cols., 1997), regulación de la presión arterial (Doolen y cols., 1998), la regulación del sistema inmune (Guerrero y Reiter, 2002), la oncogénesis (Reiter, 2003) y el crecimiento y desarrollo de tumores (Blask y cols., 2002), entre otros. Gran parte de las investigaciones relacionadas con la melatonina y la glándula pineal en los primeros 30 años después de su descubrimiento, estuvieron relacionadas con su capacidad para modular la fisiología reproductiva en mamíferos de reproducción estacional, dependientes del fotoperiodo (Kitay, 1954; Reiter, 1973; Reiter y Hester, 1966; Stetson y cols., 1975; Turek y cols., 1976).

La importancia de la melatonina como molécula indispensable para el desarrollo de la vida viene indicada por su conservación en la escala filogenética. Se ha encontrado melatonina en bacterias (Reiter, 1991; Tilden y cols., 1997), microalgas (Hardeland y Poeggeler, 2003), plantas (Manchester y cols., 2000), invertebrados y vertebrados (Vivien-Roels y Pevet, 1993). Es posible que su función inicial en formas de vida primitivas se vincule a su actividad antioxidante en relación a los radicales libres (aniones superóxidos, radicales peroxilos, radicales catiónicos, fotooxidantes y radicales hidroxilos), producidos en las bacterias por reacciones fotoquímicas y en las plantas como consecuencia inevitable de la fotosíntesis. Las concentraciones de melatonina en estas formas de vida son unas 1.000 – 10.000 veces mayores que las presentes en el hombre.

Más de 1.000 publicaciones han confirmado la capacidad de la melatonina y sus metabolitos para reducir el estrés oxidativo *in vivo* (Hardeland, 2005). Se ha demostrado que la melatonina elimina especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (Peyrot y Ducrocq, 2008; Tan y cols., 2007) en varios orgánulos subcelulares y estimula las enzimas antioxidantes (Reiter y cols., 2000; Rodríguez y cols., 2004). Estas funciones de la melatonina con un efecto ubicuo como antioxidante tienen implicaciones para el funcionamiento óptimo de las células y órganos, incluyendo el sistema reproductivo (Tamura y cols., 2008).

Aunque la acción de la melatonina como antioxidante es directa, la estimulación de las enzimas antioxidantes por esta hormona, es probable que sea mediada mediante la unión a receptores situados en la membrana, en el núcleo o en el citosol (Tomas-Zapico y Coto-Montes, 2005). Así, se han identificado receptores de melatonina en las neuronas del hipotálamo (Dubocovich y Markowska, 2005; ROY y BISHOP, 1954), en la pituitaria anterior (adenohipófisis) (Balik y cols., 2004; Johnston y cols., 2003) y en gónadas de ambos sexos (Ekmekcioglu, 2006; Kobayashi y cols., 2003). También se ha identificado el receptor en espermatozoides humanos (van Vuuren y cols., 1992). Dubocovich (1988) propuso que los receptores de melatonina fueran clasificados como ML-1 (1 melatonina, alta afinidad, rango picomolar) y ML-2 (2 melatonina, baja afinidad, rango nanomolar).

La detección de sitios de unión para la melatonina en espermatozoides puede verse limitada como consecuencia de la ocultación de éstos por residuos de ácido siálico. Van Vuuren y cols., (1992) investigaron la existencia de sitios de unión de la melatonina en espermatozoides humanos. Parece ser que el ácido siálico impide la unión de la melatonina a sus receptores y por lo tanto inhibe cualquier efecto que la melatonina pueda tener sobre la motilidad del espermatozoides (van Vuuren y cols., 1992). Se ha informado sobre la presencia de neuraminidasa en espermatozoides de mamíferos (Srivastava y cols., 1970). Se ha sugerido que esta enzima está implicada en la reacción de la zona pelúcida del óvulo durante la fecundación (Srivastava y Abou-Issa, 1977). Los resultados de Van Vuuren y cols., (1992) demostraron que la neuraminidasa, además, podía ser responsable de la eliminación de residuos de ácido siálico en espermatozoides. Se llegó a la conclusión de que el ácido siálico y la neuraminidasa en el semen pueden por lo tanto controlar los efectos de la melatonina y posiblemente también los efectos de otras hormonas en los espermatozoides.

Los efectos *in vitro* de la melatonina sobre la actividad hialuronidasa de semen, la motilidad y la anomalía morfológica fueron investigados en los

espermatozoides de toros (Tanyildizi y cols., 2006). El ácido hialurónico es un componente del cumulus oophorus de las células foliculares, que es degradado por la hialuronidasa espermática localizada en la superficie de la membrana del espermatozoide y en el interior de la membrana acrosomal (Tanyildizi y Bozkurt, 2003). Esta enzima tiene un papel importante en el paso de los espermatozoides a través de la zona pelúcida (Meyers, 2001). Se ha demostrado que la actividad hialuronidasa del semen es un índice de la capacidad fecundante y su deficiencia provoca una disminución de la capacidad fecundante de los espermatozoides en la fecundación *in vitro* (Abdul-Aziz y cols., 1996). El resultado es que la melatonina causa un efecto significativo, disminuyendo la motilidad de los espermatozoides y provocando un incremento en la actividad hialuronidasa del semen. El aumento de la actividad hialuronidasa es independiente de la disminución de la motilidad espermatozoides. Esta conclusión ya la determinaron Tanyildizi y Bozkurt (2003), quienes sugirieron que no hay ninguna relación entre la actividad hialuronidasa y la motilidad del esperma.

En 1968 se publicaron los primeros datos que indican una influencia negativa de la melatonina exógena en la reproducción de mamíferos (Wurtman y cols., 1968). Se ha documentado que la melatonina actúa como una hormona antigonadotropa, inhibiendo la liberación de gonadotropinas por la hipófisis y por tanto la espermatogénesis (Mas y Oaking, 1977; Talbot y Reiter, 1973). Además se observaron efectos negativos de la melatonina en la próstata y vesículas seminales de las ratas, sugiriendo que la melatonina es un potencial inhibidor de la espermatogénesis (Mas y cols., 1980).

Por otra parte, también se han descrito efectos beneficiosos producidos por la melatonina, ya que se ha demostrado que dosis fisiológicas de melatonina aumentan la expresión génica y la actividad enzimática de la GPx, SOD y CAT (Kilanczyk y Bryszewska, 2003; Pablos y cols., 1998; Reiter y cols., 2000; Rodriguez y cols., 2004). Algunos de los productos que se originan cuando la melatonina detoxifica las ROS también son antioxidantes eficaces.



Dentro del campo en el que se centra esta Tesis, la espermatología, se ha demostrado que los espermatozoides pueden ser protegidos del daño oxidativo por la melatonina o sus metabolitos. El diazinón es un plaguicida organofosforado ampliamente utilizado, tóxico para los espermatozoides, al provocar la formación de radicales libres. La exposición de cualquier especie animal a este compuesto compromete la espermatogénesis. Dado que se ha visto que la melatonina tiene un efecto protector contra muchos otros radicales libres procedentes de moléculas tóxicas (Reiter y cols., 2000), se especuló que podría también proteger el esperma de la toxicidad del diazinón. Tanto en la lombriz *Eisenia foetida* (Bustos-Obregon y cols., 2005) como en ratón (Sarabia y cols., 2009), el tratamiento con melatonina mejoró la espermatogénesis, la cual fue interrumpida con la exposición al diazinón. En relación a los efectos antioxidantes protectores de la melatonina, Rao y Ganghadaran (2008) la emplearon para evaluar su efecto antioxidante en espermatozoides de rata tratados con mercurio. Los resultados obtenidos llevaron a la conclusión de que dosis graduales de mercurio provocaron el agotamiento del sistema de defensa antioxidante en el semen, sin alterar la viabilidad, y la administración de melatonina inhibió significativamente el daño oxidativo causado por el mercurio.

La capacidad antioxidante de la melatonina también se ha confirmado en el proceso de centrifugación de semen humano. La centrifugación origina la formación de ROS, lo que induce daños irreversibles a los espermatozoides y su funcionalidad. Se ha demostrado que la adición de melatonina al semen antes de la centrifugación reduce la presencia de ROS en el sedimento tras la centrifugación (Aitken y Clarkson, 1988).

En un estudio donde se investigó si los efectos antioxidantes de la melatonina, el piruvato y la taurina influían en la motilidad del semen porcino almacenado *in vitro*, se incubaron alícuotas del semen con diferentes concentraciones de antioxidantes en presencia o ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La motilidad tras 6, 9 y 12 horas de incubación fue mayor en los grupos que contenían melatonina y

taurina, en comparación con el control. Los grupos de melatonina y taurina en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no mostraron efectos positivos en la motilidad. Los autores llegaron a la conclusión de que la suplementación del semen con melatonina, piruvato y taurina puede mejorar la motilidad del espermatozoide de verraco (Jang y cols., 2006). En un estudio posterior de los mismos autores, se observó que las características del semen (motilidad, viabilidad, integridad de la membrana, etc) mejoraron en los grupos tratados con melatonina respecto a los demás grupos; además los niveles formados de malondialdehído (MDA) fueron más bajos en las muestras tratadas con melatonina que en las muestras no tratadas (Jang y cols., 2010). Continuando con los resultados positivos de la melatonina descritos en este trabajo, además se ha comprobado que la tasa de desarrollo de blastocistos se incrementa significativamente en los óvulos fecundados por el semen tratado con melatonina. Por ello, la melatonina puede mejorar las características del semen durante su almacenamiento y además estimular (incrementar) la capacidad de desarrollo embrionario *in vitro*. En la especie humana, se ha demostrado el efecto estimulador de la melatonina, ya que mejora significativamente la motilidad espermática (Gulay y Aysekendircy, 1996). Este efecto positivo en la motilidad puede deberse a la capacidad que tiene la melatonina como depurador eficaz de radicales libres y como antioxidante general (Reiter, 1995; Reiter y cols., 1996).

Por otra parte, el estudio *in vitro* de los efectos de concentraciones fisiológicas de melatonina en la motilidad de los espermatozoides de ratas Wistar, muestra que la melatonina tuvo efectos negativos dependientes de las dosis en la progresión espermática, la calidad del esperma y en la motilidad (Gwayi y Bernard, 2002). Algunos, pero no todos estos efectos, se debieron al etanol (0,5% concentración final), que fue utilizado como solvente para la melatonina. La adición de etanol en el medio de incubación alteró el pH, y el aumento de pH tuvo un efecto negativo significativo en todos los aspectos de la motilidad del esperma (Gwayi y Bernard, 2002). Otros autores también describen un efecto inhibitorio de la motilidad espermática con el uso de indolaminas, dependiente del tiempo de incubación y de la dosis utilizada (Irez y cols., 1992; Tanyildizi y cols., 2006).

Es ampliamente conocido el papel esencial del AMPc y del  $\text{Ca}^{2+}$  como mensajero intracelular en la motilidad del espermatozoide de mamíferos. En este sentido, se ha descrito que la melatonina inhibe la acumulación de AMPc en las células del epidídimo de la rata (Li y cols., 1998) y en las células de la glándula pituitaria (Vanecek y Vollrath, 1989). Se ha sugerido que la melatonina inhibe el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ , disminuyendo la concentración de AMPc (Slanar y cols., 2000) y la motilidad de los espermatozoides, ya que una elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular causa un aumento en la motilidad del espermatozoide (Bains y cols., 2001). Además, se ha indicado que la melatonina tiene efectos negativos similares a la colchicina en los microtúbulos (Bornman y cols., 1989). La colchicina puede afectar a la motilidad de espermatozoides *in vitro*, probablemente por su efecto directo en los microtúbulos en lugar de causar la muerte de los espermatozoides (Ben-Chetrit y cols., 1993).

La melatonina es un compuesto con dos efectos importantes en las mitocondrias. En primer lugar, y como ya hemos descrito previamente, es un antioxidante que puede eliminar directamente ROS producidos durante el metabolismo normal de este orgánulo y promover indirectamente la actividad de las enzimas antioxidantes incluyendo SOD, GPx y CAT. En segundo lugar, la melatonina aumenta las actividades de los complejos I y IV de la cadena transportadora de electrones de las mitocondrias en condiciones normales y restaura sus actividades en algunas situaciones patológicas. Una consecuencia importante de estos efectos es que mantiene la homeostasis del glutatión en las mitocondrias y aumenta la producción de ATP.

La relación directa entre la melatonina y las mitocondrias fue observada por Yuan y Pang (1991) y por Poon y Pang (1992). Estos investigadores describieron las características farmacológicas de la melatonina en los sitios marcados con 2-[125]-Iodomelatonina en los preparados de membrana mitocondrial de cerebro de paloma (Yuan y Pang, 1991) y en el bazo de cobayas (Poon y Pang, 1992).

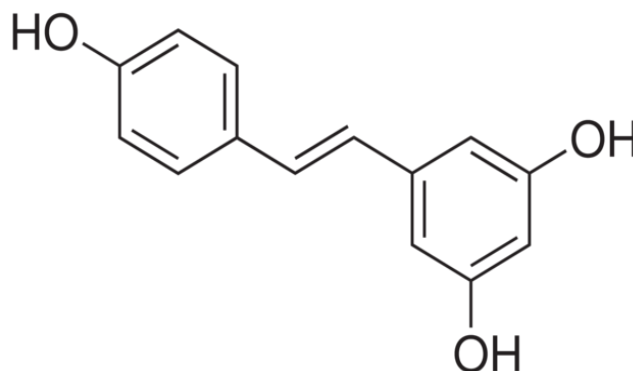
Las características moleculares de la melatonina son decisivas para entender sus efectos en las mitocondrias. La melatonina es una molécula altamente lipofílica

que cruza las membranas celulares y llega fácilmente a los compartimentos subcelulares (Menéndez-Peláez y Reiter, 1993), incluyendo las mitocondrias, donde parece que se acumula en altas concentraciones (Martin y cols., 2000). Además, la melatonina interactúa con la bicapa lipídica (Costa y cols., 1997) y estabiliza la membrana mitocondrial interna (García y cols., 1999), un efecto que puede mejorar la actividad de la cadena de transporte de electrones (Acuna-Castroviejo y cols., 2001).

La capacidad de la melatonina para influir en la homeostasis mitocondrial se ha probado en experimentos tanto *in vivo* como *in vitro*. Se ha demostrado que la melatonina aumenta en cerebro e hígado las actividades de los complejos enzimáticos respiratorios mitocondriales I y IV de una manera dependiente del tiempo tras su administración a ratas, mientras que las actividades de los complejos II y III no se ven afectadas (Martin y cols., 2000). La administración de melatonina también previene el descenso de la actividad de los complejos I y IV debido al daño mitocondrial por estrés oxidativo inducido por rojo de rutenio. Esta inducción de estrés oxidativo no causa la peroxidación lipídica, pero reduce significativamente la actividad antioxidante de la enzima GPx, un efecto que también se previene en parte por la acción de la melatonina (Martin y cols., 2000b).

## RESVERATROL Y SUS PROPIEDADES PROTECTORAS

El resveratrol es un polifenol natural clasificado como un fitoestrógeno, dada la similitud estructural del resveratrol al dietilestilbestrol (DES) y al estradiol y porque además tiene actividad moduladora del sistema de



respuesta estrogénico (Bhat y cols., 2001a). Los estrógenos, hormonas reguladoras de la actividad reproductora en la hembra, también están involucrados en el sistema reproductor masculino, principalmente controlado por andrógenos. Los estrógenos, ya sean derivados de la aromatización de los andrógenos o producidos directamente en los testículos, ejercen una acción sobre el eje reproductor neuroendocrino masculino y además tienen una actividad paracrina en los testículos (Hess y cols., 1997; Sharpe, 1998). Por lo tanto, el resveratrol, al modular la respuesta del sistema estrogénico, podría estar implicado en diferentes aspectos de la reproducción masculina.

El resveratrol es un antioxidante natural ampliamente consumido en la dieta mediterránea debido a su presencia en alimentos como los cacahuetes y las uvas. En la actualidad es una molécula que suscita gran interés ya que es un componente del vino, existiendo estudios en los que se ha comprobado una correlación inversa entre el consumo del vino y la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Juan y cols., 2005). Es por ello que ha crecido el interés por demostrar otros efectos beneficiosos para la salud. Así por ejemplo, se le atribuye actividad antioxidante y vasodilatador, moduladora del metabolismo lípidos y proteínas, y preventiva y terapéutica frente al cáncer (Aziz y cols., 2003a). El cáncer e inflamación están relacionados con la síntesis de enzimas proinflamatorias a partir del ácido araquidónico y las ciclo y lipooxigenasas. Entre otros efectos moleculares del

resveratrol se encuentra la inhibición de una variedad de enzimas como quinasas, lipo y ciclooxigenasas (COX), sirtuínas y otras proteínas. El resveratrol se une al sitio activo de las peroxidasas, lo que produce una inactivación irreversible de la enzima a la vez que la oxidación de un grupo hidroxilo del resveratrol, paso necesario para la inhibición estructural de la COX y en concreto de la COX-1 (Kennedy y cols., 2003), una enzima involucrada en la síntesis de prostaglandinas de la serie 2 (Mendonca y cols., 2000). Otras enzimas cuya actividad es inhibida por el resveratrol son las fosfodiesterasas PDE1, PDE3 y PDE4 (Park y cols., 2012). Esta inhibición de las PDEs se produce por unión del resveratrol al sitio catalítico y por competición con el AMPc (Park y cols., 2012). En las células, los niveles intracelulares de AMPc dependen de la actividad de la adenilato ciclasa (ACs) y de las fosfodiesterasas (PDEs) (Conti y Beavo, 2007), que hidrolizan el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) o el guanosín monofosfato cíclico (GMPc) a adenosín monofosfato (AMP) o guanosín monofosfato (GMP), respectivamente. El resveratrol no tiene efecto directo en la actividad de la adenilato ciclasa. Debido a que la inhibición de PDE4 tiene efectos antiinflamatorios (Torphy, 1998), esto podría explicar en parte los efectos antiinflamatorios del resveratrol.

Entre las características mencionadas y más interesantes del resveratrol hay que destacar que tiene una actividad antioxidante más intensa que la vitamina E y la C (Stojanovic y cols., 2001), que resulta menos tóxica (Kyselova y cols., 2003). Los compuestos fenólicos se incorporan fácilmente en el interior de la bicapa lipídica, y mantienen la integridad de la membrana y el equilibrio iónico celular (Halliwell y Gutteridge, 1999), actúan como eliminadores de radicales libres y, a la vez como quelantes de metales, actuando tanto en la iniciación como en la propagación del proceso oxidativo (Degáspari y Waszczyński, 2004; Soares, 2002). El mecanismo antioxidante del resveratrol podría estar relacionado con su capacidad para reducir los niveles de  $O_2^-$  y aniones de nitritos, capturando radicales peróxidos y/o  $OH^-$ , donando el electrón de hidrógeno a su grupo hidroxilo (Kasdallah-Grissa y cols., 2006). Se ha demostrado que el resveratrol es capaz de reducir los niveles de ROS en respuesta al tratamiento con  $H_2O_2$  (Dani y cols., 2008). El resveratrol también

actúa como un potente antioxidante por su habilidad para inhibir la formación de ROS tanto por sistemas enzimáticos como no enzimáticos, especialmente NADPH-oxidasas (Li Y, 2011, nova Science Publishers) y oxidorreductasas dependientes de NADH (Delmas y cols., 2005), localizadas en la membrana plasmática y en la mitocondria (Guerra y cols., 2004; Sies, 1993).

A pesar de los efectos beneficiosos que se han comentado, el resveratrol presenta un efecto dicotómico, es decir, el efecto inhibitor o potenciador de la oxidación va a depender de varios factores: la concentración de resveratrol usada, del potencial redox del oxidante, de la abundancia en iones metálicos, del pH y del compartimento subcelular en el que se encuentre (Biasutto y cols., 2008). En este sentido, estudios recientes han confirmado que bajas dosis de resveratrol protegen frente a numerosas enfermedades, pero altas dosis tienen efectos perjudiciales para la salud (Mukherjee y cols., 2010). Así por ejemplo, se ha demostrado que altas concentraciones de resveratrol (100-300  $\mu\text{M}$ ) disminuyen los niveles de ATP intracelular y activan la AMPK dependiendo del ratio AMP/ATP (Hawley y cols., 2010). Además, el resveratrol ejerce un importante efecto en la mitocondria, ya que es capaz de aumentar la producción mitocondrial de superóxidos (Low y cols., 2010), interrumpir el potencial de membrana mitocondrial (Sareen y cols., 2006; van Ginkel y cols., 2007; van Ginkel y cols., 2008) y alterar la cadena respiratoria (Zheng y Ramirez, 2000; Zini y cols., 1999).

Centrándonos en el tema de esta Tesis, la espermatología, diversos investigadores han evaluado el resveratrol por su capacidad antioxidante para tratar de mejorar la calidad espermática en distintas especies. Así, Collodel y cols., (2011) han demostrado en espermatozoides epididimarios de rata que el resveratrol en concentraciones de 6  $\mu\text{M}$  y 15  $\mu\text{M}$  estimula la motilidad progresiva. Por otro lado, Juan y cols., (2005) observaron en ratas, que tras la administración de 20 mg resveratrol/kg día en la dieta aumenta la concentración de espermatozoides epididimarios en las ratas, se reduce el diámetro y la densidad de los túbulos seminíferos, mientras que aumenta su longitud, además, la concentraciones séricas

de FSH, LH y testosterona fueron superiores en las ratas suplementadas. La hormona FSH actúa en los túbulos seminíferos estimulando la espermatogénesis, y la LH actúa como señal para la producción de testosterona por las células de Leydig. Esta testosterona es esencial para la espermatogénesis. En conejo se han descrito resultados similares a los de Juan y cols., (2005) en la rata, observándose un efecto positivo en la erección del pene, y un incremento en los niveles de testosterona en sangre, la concentración espermática testicular y la motilidad de espermatozoides epididimarios (Shin y cols., 2008). En un reciente trabajo se ha demostrado que la administración intraperitoneal de resveratrol previene la pérdida de motilidad espermática, disminuye la LPO y previene el estrés oxidativo inducido en testículos de ratas con hipertiroidismo (Ourique y cols., 2013). Asimismo, el tratamiento con resveratrol previene frente a la peroxidación lipídica inducida por etanol en testículos (Kasdallah-Grissa y cols., 2006). Debido a su capacidad antioxidante, se ha propuesto el uso del resveratrol para neutralizar el estrés oxidativo que se produce en los túbulos seminíferos. Adicionalmente, el resveratrol podría actuar disminuyendo los niveles de ROS y factores proinflamatorios en los túbulos seminíferos, además de aumentar la producción de andrógenos y de espermatozoides.

Entre otros mecanismos de acción del resveratrol en espermatozoides se ha descrito que este polifenol induce la liberación de calcio dentro de la célula germinal masculina (Breitbart y cols., 1985; Breitbart y Rubinstein, 1983), la cual varía en función del tiempo y de la concentración de resveratrol usada (Liu y cols., 2005). El control de la concentración de calcio intracelular es importante para el normal mantenimiento y funcionamiento celular (Breitbart H, 1983). Dado que el resveratrol interviene en la liberación de calcio intracelular, este efecto puede prevenir una prematura capacitación y reacción acrosómica durante la conservación, procesos regulados por la concentración de calcio intracelular (Breitbart y cols., 1985).



Otro de los efectos atribuidos al resveratrol es la disminución de la apoptosis de células germinales en ratones y ratas (Revel y cols., 2001).

En cuanto al efecto tóxico del resveratrol en la célula germinal masculina, Collodel y cols., (2011) calcularon su dosis letal 50 (DL50) tanto en espermatozoides humanos como en espermátidas de ratas, que resultó ser 50  $\mu\text{M}$ . Los espermatoцитos de rata fueron más sensibles al efecto perjudicial del resveratrol con una DL50 entre 30-50  $\mu\text{M}$ , inhibiendo la motilidad espermática a concentraciones mayores (100  $\mu\text{M}$ ).

Debido a los crecientes problemas de la sociedad actual para concebir hijos, en el campo de la medicina reproductiva ha aumentado el interés en disminuir los daños de los espermatozoides que se producen durante el proceso de criopreservación de semen humano. El resveratrol tiene efecto protector frente a la peroxidación lipídica en membranas celulares y frente al daño en el ADN provocado por las ROS (Aziz y cols., 2003b; Bhat y cols., 2001b; Roemer y Mahyar-Roemer, 2002). Aunque los espermatozoides con pérdida de la integridad del ADN son capaces de fertilizar ovocitos, los embriones producidos tiene un desarrollo anormal (Agarwal y cols., 2004). Branco y cols., (2010) observaron que la adición de resveratrol 10 mM durante el proceso de criopreservación reduce el daño al ADN en muestras procedentes tanto de hombres fértiles como infértiles. Sin embargo, no fue capaz de prevenir la disminución de motilidad inducida por el proceso de criopreservación. Debido a esta propiedad protectora del ADN, estos investigadores recomiendan la adición de resveratrol al diluyente crioprotector de semen humano, especialmente para el caso en que se vaya a utilizar la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), puesto que en este caso no son necesarios espermatozoides móviles para que se produzca la fecundación.

Garcez y cols., (2010) describieron que la adición de resveratrol (0,1-10 mM) al medio de congelación previene los daños lipídicos que se producen durante la criopreservación, tanto en hombres fértiles como en infértiles, efecto que no fue dependiente de la dosis utilizada. En las muestras procedentes de hombres

infértiles se observa un aumento de la actividad superóxido dismutasa cuando se añade resveratrol; sin embargo, al igual que en los datos de Branco y cols., (2010), la adición de resveratrol fue incapaz de prevenir la pérdida de motilidad que se produce durante la congelación-descongelación espermática.

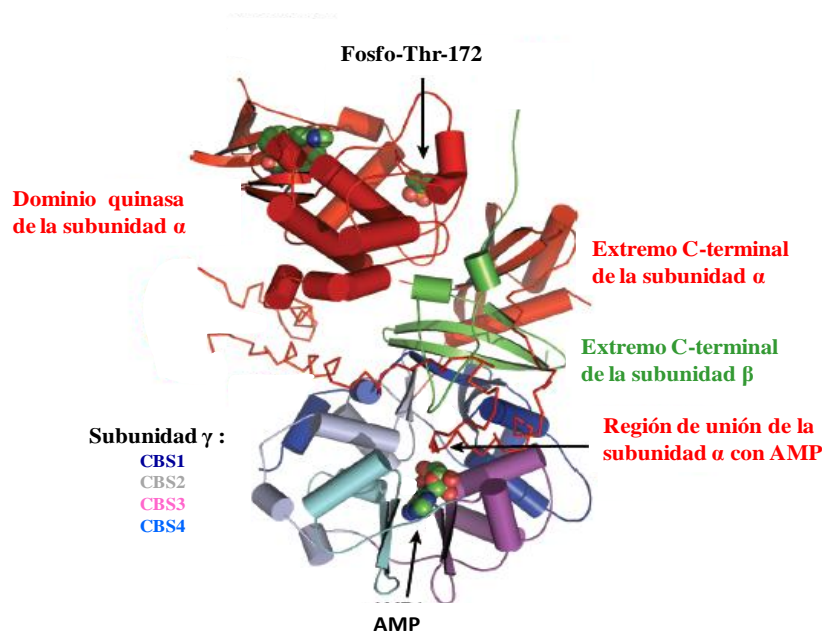
Desde que se describió que los polifenoles en espermatozoides humanos son capaces de reducir la peroxidación lipídica (Garcez y cols., 2010; Sarlos y cols., 2002), se ha evaluado su uso en la criopreservación espermática de otras especies. Silva y cols., (2012) tras la criopreservación de espermatozoides de carnero en presencia o ausencia de resveratrol (20 µg/mL), no observaron diferencias en el porcentaje de espermatozoides móviles, con el acrosoma dañado o con membrana plasmática alterada. Sin embargo, en muestras tratadas con resveratrol se observó una disminución en el potencial de membrana mitocondrial (Silva y cols., 2012). Que el potencial de membrana mitocondrial estuviera disminuido en las muestras que contenían resveratrol fue considerado por estos autores probablemente beneficioso para el espermatozoide, ya que las mitocondrias son la principal fuente de producción intracelular de ROS, junto a la cadena respiratoria en un proceso de autoxidación (Turrens, 2003), donde los polifenoles, como el resveratrol, tienen una función importante en la absorción y neutralización de las ROS, debidos a sus propiedades de oxidoreducción (Degáspari y Waszczynskyj, 2004).

## **METABOLISMO CELULAR: AMPK**

El espermatozoide, como ya hemos comentado previamente, es una célula muy especializada con una esencial compartimentalización intracelular y que, en la fase final de su desarrollo, es transcripcionalmente inactivo e incapaz de sintetizar proteínas. Por lo tanto, sus vías de regulación intracelular están basadas en la modificación post-traducciona l de las proteínas ya expresadas, como la fosforilación en residuos de tirosina, treonina o serina, catalizada por enzimas quinasas y fosfatasas, que las hacen especialmente importantes en estas células. El espermatozoide debe sufrir una serie de procesos celulares como la adquisición de movilidad, capacitación, hiperactivación y reacción acrosómica, para poder desempeñar su función esencial, la fecundación del óvulo. Todos estos procesos celulares, que están regulados por mecanismos bioquímicos, como la fosforilación de proteínas, son a su vez, dependientes de la carga energética celular, que está determinada por la proporción AMP/ATP (Ford, 2006; Miki, 2007). La regulación bioquímica del nivel energético es un proceso fundamental en cualquier organismo vivo. La concentración de ATP celular debe mantenerse en niveles relativamente altos (unas 10 veces por encima de la concentración de ADP) para lograr un correcto funcionamiento de los procesos metabólicos.

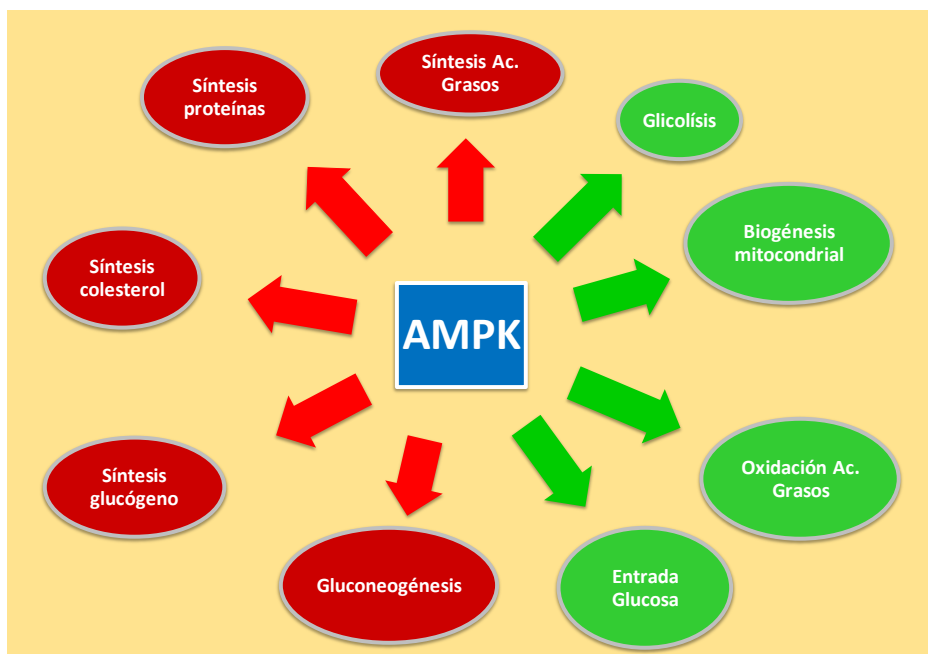
Uno de los sistemas moleculares que intervienen en el control del balance energético es la proteína quinasa activada por AMP, AMPK. La proteína AMPK, que es ubicua y se encuentra en todas las células eucariotas (Hardie, 2008). Es una serina/treonina (Ser/Thr) quinasa heterotrimérica, formada por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  (Graeme y cols., 2013; Hardie, 2007). Existen dos formas diferentes de las subunidades  $\alpha$  ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ) y  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ), mientras que existen 3 formas diferentes de la subunidad  $\gamma$  ( $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$ ) (Hardie, 2007). La subunidad  $\alpha$  es la catalítica del heterotrím ero y contiene un residuo de treonina en la posición 172, cuya fosforilación es requerida para su completa actividad enzimática (Hawley y cols., 1996). La subunidad  $\alpha$  se une a las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  por su extremo C-terminal (Crute y cols., 1998). La subunidad  $\beta$  contiene una región conservada

evolutivamente de unión a carbohidratos que permite a la proteína AMPK interactuar con partículas de glucógeno (Hudson y cols., 2003) y se ha sugerido que su función es la de un regulador que permite a la proteína AMPK detectar las reservas energéticas celulares en forma de glucógeno (McBride y cols., 2009). La subunidad  $\gamma$  contiene cuatro dominios CBS (cistationina beta  $\beta$ -sintasa) repetidos en tándem, que proporciona el sitio de unión para la regulación de los nucleótidos AMP y ATP (Graeme y cols., 2013; Scott y cols., 2004). Dos dominios CBS se unirán de manera reversible a una molécula de AMP o de ATP, el tercero se unirá de manera exclusiva a una molécula de AMP, mientras que el cuarto permanecerá desocupado incluso en presencia de altas concentraciones de AMP o ATP (Xiao y cols., 2007). Mientras que la unión con ATP mantiene a la enzima en un estado de baja actividad, el intercambio de este ATP por una molécula de AMP es suficiente para promover una activación de la quinasa por un mecanismo alostérico. Además, esta unión de la molécula de AMP a la subunidad  $\gamma$  protege de la desfosforilación de la Thr172 mediada por las proteínas fosfatasa (Davies y cols., 1995; Graeme y cols., 2013; Hardie y cols., 2011). La combinación de la activación alostérica y la fosforilación conlleva al incremento de la actividad de la enzima en más de 1.000 veces (Graeme y cols., 2013; Suter y cols., 2006).



Estructura de la AMPK, adaptado de Hardie y Alessi, 2013

La activación de la proteína AMPK está generalmente unida a una respuesta metabólica para prevenir situaciones de estrés, tanto metabólico como energético, que cursan con un aumento de la proporción AMP/ATP, bien porque la síntesis de ATP está comprometida (hipoxia, isquemia o baja disponibilidad de nutrientes) o bien porque el consumo de ATP está aumentado. La carga energética evaluada como AMP/ATP es muy sensible al estado metabólico de la célula (Hardie y Hawley, 2001), por lo que la AMPK es un excelente sensor del estado energético celular. En general, la activación de la AMPK en células somáticas estimula procesos catabólicos para generar ATP e inhibe el consumo anabólico de ATP que no es necesario para la supervivencia inmediata de la célula. Así, en relación al metabolismo de carbohidratos, la activación de la AMPK está asociada con una disminución de la síntesis de glucógeno, debido a una fosforilación directa de la glucógeno sintasa en el residuo de Ser7 que inhibe su actividad (Carling y Hardie, 1989). Además, esta proteína en estado de déficit energético, estimula la glicolisis a través de la activación de las fosfofructoquinasa 2 y 3 (PFK2/3) y permite la entrada de glucosa a través de la familia de transportadores GLUT (Hardie y Alessi, 2013).



Esquema de las rutas metabólicas reguladas por AMPK. En verde se representan las rutas metabólicas activadas por AMPK y en rojo aquellas que son inhibidas.

En relación al control de metabolismo de lípidos, la activación de la proteína AMPK estimula la oxidación de ácidos grasos, que es otra vía para aumentar la carga energética celular. La AMPK fosforila directamente la acetil-CoA carboxilasa (ACC), tanto la isoforma 1 como la 2, en los residuos de Ser79 y Ser21 respectivamente (Hardie y Pan, 2002). La ACC es la enzima que cataliza la reacción de formación del malonil-CoA a partir de acetil-CoA y que constituye el paso inicial y más regulado de la síntesis de lípidos (Hardie y Pan, 2002). El malonil-CoA es un inhibidor alostérico de la carnitina palmitoil transferasa CPT1b (Mills y cols., 1983), la proteína responsable de la entrada de ácidos grasos dentro de la mitocondria para que se produzca su  $\beta$ -oxidación. La fosforilación de la ACC por la AMPK conlleva su inactivación (Hardie y Pan, 2002), que se traduce en una inhibición de la síntesis de ácidos grasos y por tanto, del malonil-CoA. A su vez, el descenso de los niveles de malonil-CoA provoca una menor inhibición de la CPT1b, lo que conlleva a un aumento del flujo de ácidos grasos hacia la mitocondria donde se catabolizarán mediante la  $\beta$ -oxidación. Esta inducción de la  $\beta$ -oxidación debida a la activación de la AMPK contribuye, junto al aumento de la actividad glicolítica mencionado, a aumentar los niveles de ATP necesarios para los requerimientos energéticos de la célula.

Como ya se ha mencionado, los efectos más conocidos de la AMPK se ejercen en la regulación del metabolismo, donde también se incluye la síntesis de colesterol y la síntesis de proteínas. Sin embargo, recientemente se están describiendo nuevas funciones de esta quinasa como la regulación de la biogénesis de mitocondrias (Graeme y cols., 2013).

Aunque el modelo más clásico de activación de la AMPK se basa en el aumento de la proporción AMP/ATP, se han descrito otros tipos de estímulos generalmente ligados al estrés celular, como el estrés hiperosmótico (Fryer y cols., 2002b), capaces de activar la AMPK y que no alteran esta proporción, sugiriendo que hay otros mecanismos bioquímicos involucrados en la activación de la AMPK (Carling, 2004). En este sentido, recientemente se ha identificado a la quinasa de la

quinasa activada por calcio y calmodulina (CAMKK) como una de las enzimas que activan la AMPK por fosforilación en la Thr172 de su subunidad catalítica  $\alpha$ , concretamente tanto la isoforma CaMKK $\alpha$  como la CaMKK $\beta$  (Hardie y cols., 2006; Long y Zierath, 2006). La activación de la AMPK por CaMKK $\alpha/\beta$  está inducida por un aumento de la concentración intracelular de calcio, sin un apreciable cambio en la relación AMP/ATP. En este sentido, la vía intracelular de activación de la proteína AMPK en células somáticas podría estar regulada por diferentes mecanismos que, a su vez, podrían ser específicos del tipo celular en estudio. En la actualidad hay un gran interés científico en el estudio de la proteína AMPK puesto que se ha visto involucrada en el control del crecimiento y proliferación celular. Esto se debe, en parte, a la identificación de la quinasa que funciona como supresora de tumores LKB1 como otra de las enzimas reguladoras de la activación de la AMPK al catalizar su fosforilación también en el residuo Thr172 (Hawley y cols., 2003; Shaw y cols., 2004; Woods y cols., 2003). Mutaciones en el gen LKB1 son responsables del síndrome de Peutz-Jeghers en humanos, un tipo de predisposición al cáncer que se hereda de forma autosómica dominante y que cursa con el desarrollo de pólipos hamartomatosos benignos en el tracto gastrointestinal (Hemminki, 1999). Otros autores sugieren que la proteína AMPK actúa como un punto de control metabólico para determinar si las fuentes de energía celular son suficientes para la progresión del proceso de división celular que demanda gran cantidad de energía (Jones y cols., 2005).

Está ampliamente demostrado que en el espermatozoide se producen incrementos en la concentración de calcio intracelular relacionados con la regulación de la movilidad, la capacitación y la reacción acrosómica. Por otra parte, Baker y cols., (2004) demostraron en espermatozoides humanos y de ratón que el calcio extracelular provoca una disminución de los niveles intracelulares de ATP y proponen un modelo en el que los niveles de ATP tiene un papel fundamental en la señalización de los procesos fisiológicos que ocurren en espermatozoides humanos *in vivo* (Baker y cols., 2004). Asimismo, el espermatozoide sufre diferentes tipos de estrés oxidativo y osmótico durante su tránsito por el tracto genital femenino, el

cual precede a la fertilización del ovulo. Estos tipos de estrés también se ocasionan en los espermatozoides durante la conservación, refrigeración o congelación antes de su uso para la IA (Gogol y Pieszka, 2008; Rath y cols., 2009).

Todos los estudios sobre la ruta intracelular de la AMPK se han realizado exclusivamente en células somáticas hasta 2008, en que Towler y cols., (2008) demostraron que una isoforma corta de una de las quinasas que fosforila la AMPK, la proteína LKB1, denominada LKB1s, se expresa de forma predominante en células espermáticas haploides de los testículos de mamíferos. Los ratones *knockout* para LKB1s presentan una dramática reducción en el número de espermatozoides maduros en el epidídimo y los pocos espermatozoides que se producen son inmóviles, tienen morfoanomalías en la cabeza y funcionalmente son estériles (Towler y cols., 2008). Estos datos sugieren que la isoforma LKB1s tiene una función esencial durante la espermiogénesis y en la fertilidad en ratones. Por otro lado, se han identificado en espermatozoides humanos diferentes miembros (TSSK2, TSKS y SSTK) de la familia de serina/threonina quinasas específicas de testículos, TSSK (Xu y cols., 2007), a la cual pertenece la rama de la AMPK en el árbol del quinoma en humanos. La delección de TSSK1 y TSSK2 causa infertilidad en ratones debido a una haploinsuficiencia (Xu y cols., 2008). Recientemente, nuestro grupo de investigación (Hurtado de Llera y cols., 2012) ha descrito por primera vez la expresión de la proteína AMPK en espermatozoides de cerdo. Hurtado de Llera y cols., (2012) muestran la expresión de la AMPK y la presencia de su forma activa, evaluada mediante su fosforilación en el residuo Thr172 de su subunidad catalítica  $\alpha$ , en espermatozoides porcinos. En este reciente trabajo, se muestra que la inhibición de la AMPK con compuesto C provoca una disminución del porcentaje de espermatozoides móviles y de sus distintos tipos de velocidad tanto en un medio capacitante como en un medio no capacitante. Por otra parte, se demostró que la inhibición de la AMPK tiene un efecto protector en espermatozoides, ya que se observó que en presencia de compuesto C existía un porcentaje mayor de espermatozoides vivos. Como conclusión, nuestro trabajo indica que la AMPK desempeña un papel importante en la regulación de la movilidad en los



espermatozoides porcinos. Más recientemente nuestro grupo de investigación ha mostrado que la AMPK de manera adicional interviene en el mantenimiento de la estabilidad de las membranas plasmática y acrosomal, además está implicada en el correcto mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial en espermatozoides porcino (Hurtado de Llera y cols., 2013).

### **Activadores de la proteína AMPK:**

El primer activador de la proteína AMPK que se describió fue el AICAR (5-aminoimidazol-4-carboxamida ribósido)(Corton y cols., 1995; Sullivan y cols., 1994). El AICAR penetra en el interior de la célula gracias a la acción de transportadores de adenosina (Gadalla y cols., 2004) y una vez dentro es convertido por adenosina quinasa en el derivado monofosforilado, ZMP, que se une a la subunidad  $\gamma$  e imita el efecto del AMP, provocando la activación alostérica de la quinasa e inhibiendo su desfosforilación (Corton y cols., 1995). Sin embargo, el AICAR también tiene efectos independientes de la AMPK debido a la interacción con otras enzimas reguladoras del AMP.

La metformina es un derivado de la guanidina que ha sido usado para el tratamiento de la diabetes desde hace más de 50 años y actualmente se usa para el tratamiento de la diabetes tipo 2. El efecto de la metformina es una reducción de los niveles de glucosa en sangre principalmente por inhibición de la gluconeogénesis hepática (Hundal y cols., 2000). La metformina no activa directamente a la proteína AMPK y no tiene efecto directo en su fosforilación o en la desfosforilación (Hawley y cols., 2002), estando aún en debate el mecanismo por el que activa la AMPK. Uno de los efectos claros de la metformina es la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (El-Mir y cols., 2000; Owen y cols., 2000), lo que sugiere la activación indirecta de la AMPK por el incremento intracelular de la proporción AMP/ATP, entre otros posibles mecanismos de acción.

Las tiazolinedionas (TZDs), entre las que se incluyen troglitazona, rosiglitazona y pioglitazona, constituyen una segunda clase de fármacos sensibles a

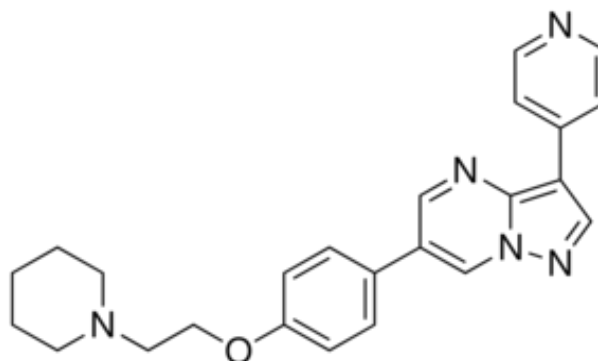
la insulina que parece tener efecto antidiabético en parte por la activación de la AMPK asociada con un aumento en la proporción AMP/ATP (LeBrasseur y cols., 2006). Presentan un efecto similar a las de las biguanidinas, al inhibir el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Brunmair y cols., 2004) y por lo tanto su mecanismo de acción podría estar mediado por una alteración de los niveles celulares de nucleótidos de adenina.

Entre los activadores de la proteína AMPK también encontramos productos naturales derivados de plantas, como la berberina, un alcaloide presente en plantas y que se usa en la medicina tradicional china. Su actividad también es indirecta, similar a la metformina y TDZs, inhibiendo el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Turner y cols., 2008; Yin y cols., 2008). Otros productos de plantas que han sido descritos como activadores de la proteína AMPK son: quercetina (Ahn y cols., 2008; Suchankova y cols., 2009), curcumina (Fujiwara y cols., 2008), isoginkgetina (Liu y cols., 2007), ginsenosida (Hwang y cols., 2009) y triterpenoides (Tanabe y cols., 1975). Sin embargo, los efectos *in vivo* de estos nuevos activadores están siendo estudiados en la actualidad y todavía no se sabe cuál es el mecanismo de activación de la AMPK. Entre los derivados de plantas también encontramos al resveratrol, ya mencionado anteriormente en esta introducción.

En los últimos años se ha desarrollado un activador directo de la proteína AMPK: la thienopiridona A769662 (Cool y cols., 2006). De forma similar al AMP, el compuesto A-769662 tiene dos efectos: activación de la AMPK mediante un mecanismo alostérico y por inhibición de la desfosforilación del residuo de Thr172 (Goransson y cols., 2007; Scott y cols., 2004). Otro activador farmacológico de la AMPK, es el PT1 (Pang y cols., 2008), que parece aumentar la actividad de la proteína AMPK al antagonizar su autoinhibición mediada por el dominio autoinhibidor de la subunidad  $\alpha$ .

### **Inhibidor de la proteína AMPK**

El único inhibidor farmacológico conocido de la proteína AMPK es el compuesto C (6-[4-2-(piperidin-1-il-etoxi)-fenil]-3-piridin-4-il-pirazolo [1,5- $\alpha$ ] pirimidina). Es un potente, selectivo y



reversible inhibidor de la actividad quinasa de AMPK al competir con el ATP, y que no tiene un efecto inhibitor en otras quinasas con estructura similar, entre las que se incluyen: ZAPK, SYK, PKA y JAK3 (Zhou y cols., 2001). Se ha demostrado que el compuesto C antagoniza los efectos del AICAR en células somáticas inhibiendo la entrada del AICAR dentro de la célula (Fryer y cols., 2002a). Además, previene la inactivación enzimática de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) que producen el AICAR o la metformina (King y cols., 2006). Finalmente es importante destacar que nuestro grupo ha mostrado recientemente que el compuesto C es capaz de bloquear la fosforilación (actividad) de la AMPK en espermatozoides porcinos cuando es usado a una concentración de 30  $\mu$ M (Hurtado de Llera y cols., 2012; Hurtado de Llera y cols., 2013).

# **Objetivos**



Basándonos en los antecedentes bibliográficos anteriormente expuestos nos propusimos alcanzar los siguientes objetivos:

1. Estudiar la influencia de la raza del verraco en la capacidad de dos diluyentes seminales, MR-A y XCell, de preservar a largo plazo la motilidad y viabilidad espermáticas en dosis seminales de cerdo conservadas a 17°C.
2. Evaluar si la adición de melatonina a dosis seminales de cerdo mejora la calidad espermática durante la conservación a largo plazo a 17°C.
3. Evaluar si la adición de resveratrol a dosis seminales de cerdo mejora la calidad espermática durante la conservación a largo plazo a 17°C.
4. Estudiar la expresión y la función de la proteína AMPK en espermatozoides de cerdo conservados durante 10 días en dosis seminales a 17°C.



# **Material y Métodos**





## **ANIMALES Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS**

Todas las muestras seminales utilizadas en los diseños experimentales procedieron de eyaculados de verracos pertenecientes a las razas Ibérico, Duroc, Pietrain y German Large. Los sementales tenían una edad comprendida entre los 2 y 5 años y estaban alojados en centros de producción de dosis seminales para uso a nivel comercial. Todos los verracos utilizados eran fértiles, como así lo demuestran los resultados de fertilidad y prolificidad de cerdas inseminadas con las dosis seminales elaboradas a partir de sus eyaculados.

La recolección del semen se realizó en la sala de extracción mediante la utilización de un potro fijo. El operario, tras limpiar y desinfectar la zona prepucial y mediante estimulación manual (método de la mano enguantada o “gloved hand method”) procedió a la extracción del eyaculado. Se desechó la porción preespermática y el resto del eyaculado fue recogido en un termo atemperado a 38°C, provisto de una gasa estéril para evitar el paso de la fracción gelatinosa procedente de las glándulas de Cowper (tapioca) u otras partículas contaminantes. Inmediatamente tras la recogida del eyaculado se realizó su análisis macroscópico (color, opacidad y olor) y se calculó el volumen por pesada. Seguidamente se evaluó la concentración, motilidad y morfoanomalías. Sólo aquellos eyaculados con al menos un 80% de espermatozoides con morfología normal, un 70 % de espermatozoides móviles y un número de espermatozoides totales superior a  $1.000 \times 10^6$  fueron utilizados para la realización de los ensayos experimentales.

<b>COMPONENTES (g/L)</b>	<b>BTS</b>	<b>XCELL®</b>	<b>MR-A®</b>	<b>VITASEM LD®</b>
<b>Glucosa</b>	37	desconocido	+	+
<b>Citrato sódico</b>	6	desconocido	+	desconocido
<b>EDTA</b>	1,25	desconocido	+	+
<b>NaCO<sub>3</sub></b>	1,25	desconocido	+	+
<b>KCl</b>	0,75	desconocido	+	desconocido
<b>BSA</b>	-	+	+	desconocido
<b>Cisteína</b>	-	desconocido	+	desconocido
<b>Acetato potásico</b>	-	desconocido	+	desconocido
<b>MOPS</b>	-	desconocido	+	desconocido
<b>mOsm/L</b>	330	315	290	290
<b>pH</b>	7,2	7,1	6,9	7,8

Tabla 1: Componentes de los diluyentes seminales comerciales utilizados. En la mayoría de los diluyentes no se especifica la composición por intereses comerciales

Una vez recogidos los eyaculados se procedió a la preparación de dosis seminales por dilución del eyaculado con el volumen apropiado de diluyente comercial indicado en cada diseño experimental: BTS (Minitub Ibérica, Tarragona España), Vitasem LD® (Magapor, Zaragoza, España), XCell® (IMV Technologies, L'Aigle, Francia) ó MR-A® (Kubus, Madrid, España) mantenido a la misma temperatura que el eyaculado. Tras la dilución se dejan equilibrar las dosis seminales a la temperatura ambiente durante 2 horas. Una vez equilibrada la temperatura las dosis seminales se conservan en un incubador a 17°C hasta su análisis.



Imagen: recolección de eyaculado mediante la técnica de la “mano enguantada”

## **EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIANTE UN SISTEMA COMPUTERIZADO DE ANÁLISIS SEMINAL (ISAS®)**

Para la determinación de la motilidad objetiva de los espermatozoides se usó un sistema computerizado de análisis seminal (CASA, o *Computer Assisted Sperm Analysis*). El sistema CASA se basa en la digitalización de las imágenes de los espermatozoides a partir de un campo microscópico, mediante la identificación de cabezas en base a su tamaño, forma y luminosidad. Una vez identificadas, las posiciones sucesivas de las mismas permiten el análisis de las trayectorias generadas. Estos sistemas han demostrado tener una gran precisión y repetibilidad (Verstegen y cols., 2002).

El análisis de la motilidad se realiza en muestras seminales previamente calentadas durante al menos 30 minutos a 38,5°C y con una concentración de 30-50 x 10<sup>6</sup> espermatozoides mL<sup>-1</sup>. De cada muestra se cogen 2 µl y se depositan en el borde de una cámara de análisis de motilidad precalentada a 38,5°C (Leja®, Luzernestraat, Holanda). La motilidad se determinó usando los sistemas ISAS® (Proiser R+D, Paterna, Valencia, España) o SpermVision® (Minitüb, Tiefenbach, Alemania). El análisis de la motilidad se basa en la captura de varios campos en cada uno de los cuales se analizan 25 imágenes consecutivas digitalizadas, con una velocidad de captura entre imágenes de 40 milisegundos. Para la captura de las imágenes utilizamos una cámara BASLER (sistema ISAS®) o AccuPixel TM6760CL (sistema SpermVision®) con un objetivo de contraste de fase negativo 10X. Al menos 300 espermatozoides son analizados en cada muestra seminal. El número de partículas identificadas incorrectamente como espermatozoides se minimiza ajustando el tamaño de partícula, el número mínimo de imágenes por segundo para analizar la trayectoria y los valores de conectividad. Tras la captura y análisis, los campos se reanalizan y eliminan los espermatozoides que presentaban trayectorias absurdas y las partículas incorrectamente identificadas como espermatozoides.

Se registraron los siguientes parámetros o descriptores de la motilidad de los espermatozoides:

PARÁMETRO	DEFINICIÓN	UNIDAD
<b>VELOCIDAD RECTILÍNEA (VSL)</b>	Distancia recorrida por el espermatozoide entre el primer punto y el último de su trayectoria	$\mu\text{m/s}$
<b>VELOCIDAD CURVILÍNEA (VCL)</b>	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo	$\mu\text{m/s}$
<b>VELOCIDAD MEDIA (VAP)</b>	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media en función del tiempo	$\mu\text{m/s}$
<b>ÍNDICE DE LINEALIDAD (LIN)</b>	Relación porcentual entre la VSL y la VCL	%
<b>ÍNDICE DE RECTITUD (STR)</b>	Relación porcentual entre la VSL y la VAP	%
<b>ÍNDICE DE OSCILACIÓN (WOB)</b>	Relación porcentual entre la VAP y la VCL	%
<b>AMPLITUD MEDIA DEL DESPLAZAMIENTO LATERAL DE LA CABEZA (ALH)</b>	Desplazamiento medio efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal	$\mu\text{m}$
<b>FRECUENCIA DE BATIDO DE LA COLA (BCF)</b>	Frecuencia con la cual la trayectoria curvilínea atraviesa la lineal en función del tiempo	Hz
<b>MÓTILES PROGRESIVOS (MP)</b>	Porcentaje de espermatozoides móviles con un valor de STR > 80%	%
<b>ESTÁTICOS</b>	Porcentaje de espermatozoides con VAP < 10 $\mu\text{m/s}$	%
<b>ESPERMATOZOIDES RÁPIDOS</b>	VAP > 80 $\mu\text{m/s}$	%
<b>HIPERACTIVIDAD</b>	Porcentaje de espermatozoides móviles que cumplen los siguientes parámetros: VCL $\geq$ 95 $\mu\text{m/s}$ , LIN $\leq$ 30%, ALH > 3,5 $\mu\text{m}$ y WOB $\leq$ 70%	%

Tabla 2: Parámetros analizados por el sistema CASA

## ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una técnica que consiste en el análisis rápido de células individualizadas y orgánulos subcelulares, suspendidos en un flujo laminar, sobre los que incide un rayo láser. El análisis de la desviación del haz de luz, de su intensidad y de la fluorescencia que emiten los distintos fluorocromos con los que podemos marcar las células nos da información sobre el estado funcional, presencia o ausencia de determinados antígenos, pH, estado Redox, etc.

El citómetro de flujo consta de 3 partes bien diferenciadas: un sistema de inyección, un sistema óptico y un sistema digitalizado de análisis de datos. Tras la inyección, la muestra queda vehiculada en una solución salina a alta presión, produciéndose un flujo laminar que hace que los espermatozoides queden alineados a su paso por el haz del láser. Al atravesar las células el haz de luz, éstas interactúan con el láser, causando la dispersión de la luz. Cuando la difracción de la luz tiene lugar en sentido frontal se puede evaluar el tamaño de las células (parámetro denominado *Forward Scatter*), mientras que con la medición de la reflexión de la luz de manera lateral se evalúa la granularidad o complejidad de éstas (parámetro denominado *Side Scatter*).

Además, para obtener información adicional, los espermatozoides pueden ser marcados con fluorocromos, que tienen la capacidad de absorber fotones procedentes de las radiaciones luminosas del espectro visible o del ultravioleta. Esta absorción de fotones provoca la redistribución de los electrones, que tienden a volver a su estado normal, liberando energía a una longitud de onda diferente. Proporcionan información sobre diferentes componentes del espermatozoide, tanto a nivel subcelular como molecular. El uso de moléculas fluorescentes distintas (con distintos espectros de emisión de fluorescencia) permite analizar la presencia de varios marcadores de manera simultánea.

Cada fluorocromo tiene un espectro de emisión distinto, y para poder detectar esta emisión el citómetro de flujo dispone de un sistema óptico que

consiste en una serie de filtros alineados que dejan pasar ciertas longitudes de ondas y reflejan otras. Tras los filtros se disponen los espejos dicróicos que están inclinados 45° y reflejan la luz hacia los detectores que se comportan como fotomultiplicadores. Los citómetros de flujo suelen constar de 3 fotodetectores (FL): el FL1 (detecta longitudes de onda entre 520 y 575 nm, color verde), el FL2 (detecta longitudes de onda entre 575-620 nm, color naranja) y la FL3 (detecta longitudes de onda >620 nm, color rojo). Cuando la luz alcanza los fotodetectores, se genera una pequeña señal, con un voltaje de amplitud proporcional a la cantidad de luz que es recibida por el fotodetector. Este voltaje será amplificado y la señal finalmente será analizada por el sistema informático. Por lo tanto, de cada espermatozoide obtendremos la información de su tamaño (FSC), complejidad (SFS) y de la fluorescencia emitida (FL1, FL2 ó FL3).

Los análisis de citometría de flujo se realizaron excitando los fluorocromos con un láser de argón de longitud de onda de 488 nm. Un total de 10.000 eventos (basados en el FSC y en el SFC analizados en modo lineal) fueron analizados por cada muestra seminal, con una velocidad de paso de unos 500 eventos/segundo. Los datos de fluorescencia fueron obtenidos en modo logarítmico.

Los parámetros funcionales de los espermatozoides de cerdo que se evaluaron mediante el citómetro de flujo Coulter EPIC XL (Beckman Coulter Ltd.) fueron la viabilidad, el estado de desorganización de los fosfolípidos de membrana, la integridad de la membrana acrosómica y el estado del potencial de membrana mitocondrial, usando para analizar los datos el programa informático EXPOTM 32 ADC (Beckman Coulter, Inc.).

En el caso del análisis de las poblaciones de espermatozoides con alto o bajo calcio intracelular, se usó el citómetro de flujo DAKO Galaxy (DAKO, Hamburgo, Alemania), analizándose posteriormente los resultados mediante el software FloMax1 (versión 2.4, Partec, Münster, Alemania).



FLUORÓFORO	EXCITACIÓN(nm)	EMISIÓN(nm)	CONCENTRACIÓN	TIEMPO(min)
<b>SYBR-14</b>	488	518	2µM	20
<b>IP</b>	536	617	5µM	5/20
<b>M540</b>	555	578	4µM	2
<b>YOPRO-1</b>	491	509	0,08 µM	5
<b>JC-1</b>	500/590	525/595	1 µM	30
<b>PNA-FICT</b>	495	519	0,05 µg/ml	5
<b>FLUO3-AM</b>	506	526	2,5 µg/ml	3/60
<b>HOECHST33342</b>	361	486	0,75µg/ml	3/60

Tabla 3: sondas fluorescentes usadas en citometría de flujo

### **Evaluación de la viabilidad espermática:**

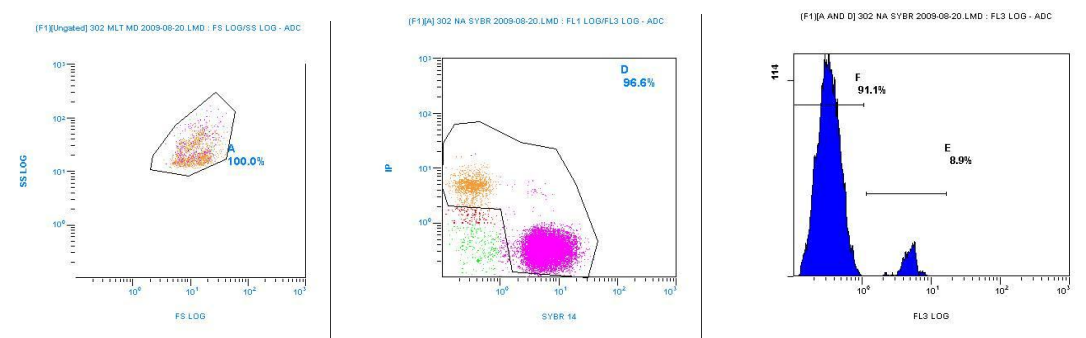
Para la evaluación de la viabilidad espermática se usó el Kit de Viabilidad espermática LIVE/DEAD (Molecular Probes®, USA). Este kit está compuesto por dos sondas:

-SYBR-14: es una sonda fluorescente con una longitud de onda de absorción de 488 nm y de emisión de 518 nm (FL1). El SYBR-14 penetra en el espermatozoide uniéndose al ADN y emite en color verde cuando es excitado. Permite diferenciar los espermatozoides de otras partículas presentes en la solución.

- Ioduro de Propidio (IP): es una sonda fluorescente con una longitud de onda de absorción de 536 nm y de emisión de 617 nm (FL3). El IP penetra en la célula cuando se ha producido una pérdida en la integridad (daño) de la membrana

citoplasmática, uniéndose al ADN y emitiendo en color rojo cuando es excitado. Estos espermatozoides teñidos con ioduro de propidio se consideran no viables o muertos.

Para la evaluación de la viabilidad espermática 100  $\mu$ l de cada muestra seminal ( $30 \times 10^6$  células/mL), se diluyen con 400  $\mu$ l de tampón isotónico (Coulter Isoton II Diluent, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA), se añade 5  $\mu$ l de SYBR-14 (2  $\mu$ M, concentración final) y 10  $\mu$ l de ioduro de propidio (5  $\mu$ M, concentración final), y se incuban 20 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, las células son analizadas por el citómetro de flujo y el resultado se expresa como el porcentaje de espermatozoides SYBR-14<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup> (espermatozoides viables).



Citogramas correspondientes a la evaluación de la viabilidad espermática (tinción con SYBR-14 e IP). Citograma izquierdo, selección de la población en función de los valores de FS y SS. Citograma central, análisis de la fluorescencia: eje X, FL1 espermatozoides marcados con SYBR-14; eje Y, FL3 espermatozoides marcados con IP. Citograma derecho, representación de la fluorescencia de aquellas partículas identificadas como espermatozoides, que se corresponde con la población D del citograma central y donde observamos un 91,1 % de espermatozoides vivos (SYBR-14<sup>+</sup>)

### **Evaluación de la integridad de la membrana acrosómica:**

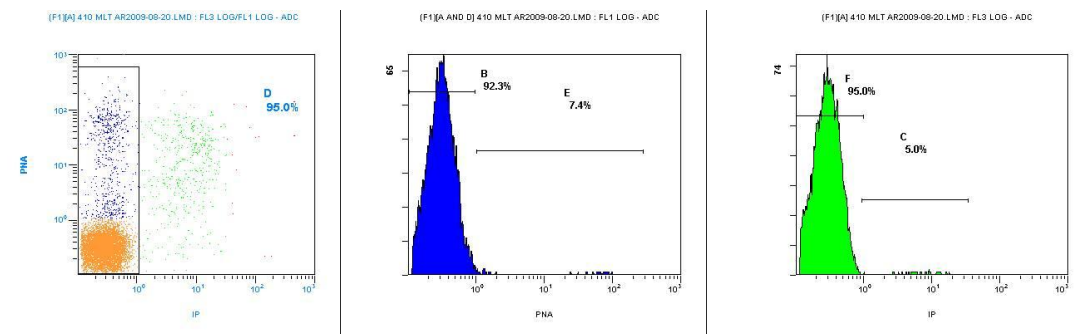
En esta evaluación se utilizó una tinción fluorescente compuesta por dos sondas (Waterhouse y cols., 2004):

-PNA-FITC (Sigma®, Saint Louis, Missouri, EE.UU.): es una aglutinina procedente del cacahuete unida a una sonda fluorescente (Isocianato de

Fluoresceína) que tiene una longitud de onda de absorción de 495 nm y de emisión de 519 nm (FL1). El PNA se une a residuos de  $\beta$ -galactosa de la membrana acrosómica. Estas lectinas no son capaces de penetrar la membrana plasmática, por lo tanto sólo se fijan a espermatozoides con acrosoma reaccionado o dañado.

- Ioduro de Propidio (IP): componente B del kit de viabilidad espermática.

El protocolo seguido para la evaluación de la integridad acrosómica fue el siguiente: 100  $\mu$ l de cada muestra seminal ( $30 \times 10^6$  célula/mL) se incuban a temperatura ambiente y en oscuridad durante 5 minutos con 5  $\mu$ L de PNA-FITC (0,05  $\mu$ g/mL, concentración final) y 5  $\mu$ L de IP (6  $\mu$ M, concentración final). Inmediatamente antes del análisis se añaden 400  $\mu$ l de tampón isotónico a cada muestra y se mezcla suavemente. Las muestra se analizan por citometría y el resultado se expresa como el porcentaje de espermatozoides PNA<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup> (espermatozoides viables con la membrana acrosómica dañada o reaccionada).



Citogramas que representan la población de espermatozoides con el acrosoma reaccionado (tinción con PNA-FITC e IP). Citograma izquierdo, selección de la población de interés (D): espermatozoides vivos (IP<sup>-</sup>) y acrosómicamente reaccionados y/o dañados (PNA-FITC<sup>+</sup>). Citograma central, análisis de la fluorescencia de la población D en el eje X, FL1, espermatozoides teñidos con PNA-FITC, donde se aprecia un 7,4% de espermatozoides acrosómicamente reaccionados y/o dañados (PNA-FITC<sup>+</sup>) Citograma derecho, análisis de la fluorescencia en el eje Y, FL3 espermatozoides marcados con IP, los espermatozoides muertos suponen el 5% de toda la población espermática analizada

### **Evaluación de la fluidez de la membrana plasmática**

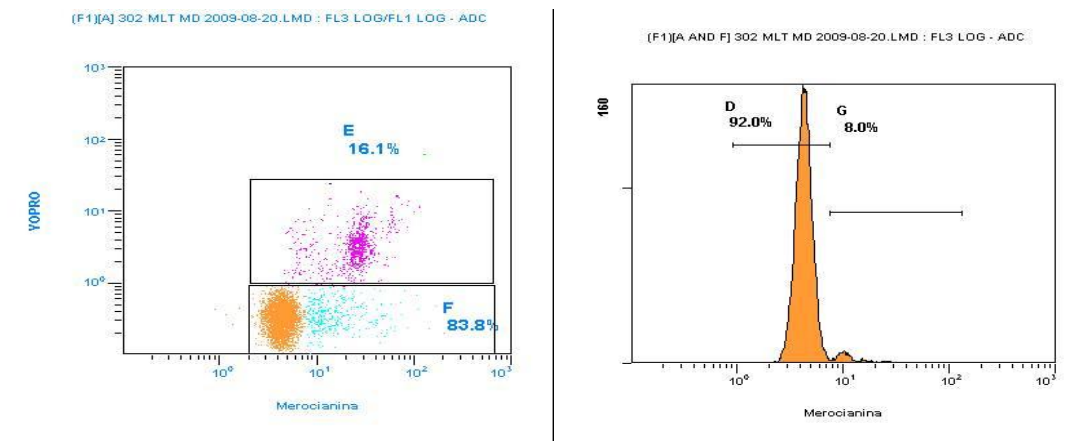
La fluidez de la membrana plasmática fue evaluada después de teñir los espermatozoides con merocianina 540 (M-540, Molecular probes®, Eugene,

Oregon, USA) y YoPro-1 (Molecular Probes®, Eugene, Oregon, USA) (Harrison y cols., 1996).

-Merocianina: es un fluorocromo que indica el grado de ordenamiento de los lípidos de membrana, ya que este compuesto se une preferentemente a membranas con altos niveles de desestructuración lipídica. Emite a 578nm (FL3).

-YoPro-1: es una sonda semipermeable con afinidad por el ADN. Al igual que el IP, evalúa la viabilidad espermática (FL1).

100 µl de cada muestra seminal (30 x 10<sup>6</sup> células/mL) se diluyen con 400 µl de tampón isotónico, a los que se añaden 2 µL de YoPro-1 (0,08 µM, concentración final). La mezcla se homogeniza y se incuba durante 15 minutos a 38°C en oscuridad. Antes del análisis, se añaden 2 µL de M-540 a cada muestra (4 µM, concentración final) y se incuba durante 2 minutos a 38°C, tras los cuales la muestra se vuelve a homogeneizar antes de su análisis en el citómetro de flujo. El resultado del análisis se expresa como el porcentaje de espermatozoides viables con la membrana plasmática inestable (YoPro-1<sup>-</sup>/M-540<sup>+</sup>).

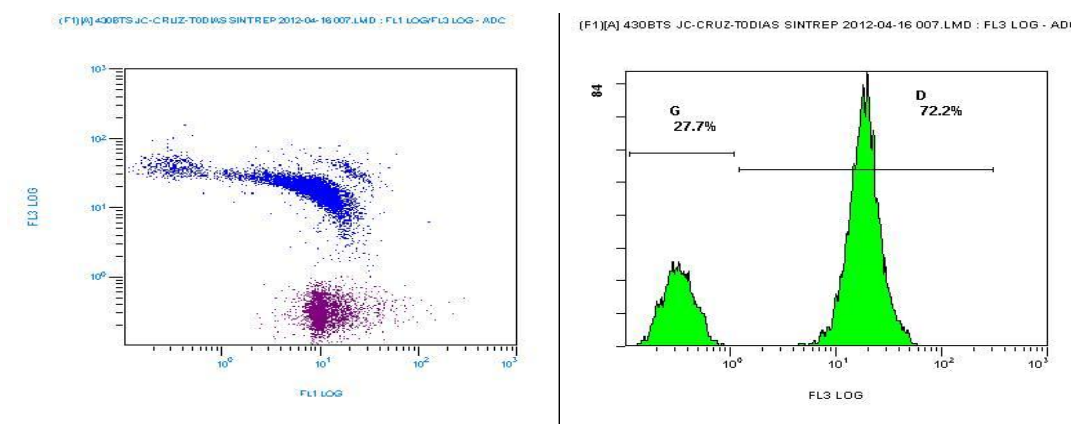


Citogramas que representan la población de espermatozoides con desorganización de lípidos de membrana (tinción con M-540 y YoPro-1) Citograma izquierdo, selección de la población de interés (F): espermatozoides vivos (YoPro-1<sup>-</sup>) y con desorganización de los fosfolípidos de la membrana plasmática (M-540<sup>+</sup>). Citograma derecho, análisis de la fluorescencia de la población F, en el eje X, FL3, espermatozoides teñidos con M-540, donde se aprecia que el 8% de los espermatozoides vivos que tienen una alta desorganización de fosfolípidos de membrana (M-540<sup>+</sup>)

### Evaluación del estado del potencial de membrana mitocondrial

Para la evaluación del potencial de membrana mitocondrial se utilizó el catión lipofílico JC-1 (5,5'.6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide, Molecular Probes®, USA). Este fluorocromo emite en el espectro del verde (525 nm, FL1) cuando el compuesto se encuentra en estado monomérico, indicando un potencial de membrana mitocondrial bajo. Cuando se oxida, el compuesto forma agregados y emite en el espectro del naranja (595 nm, FL3), indicando un potencial de membrana mitocondrial alto.

100  $\mu$ l de cada muestra seminal (30 x 10<sup>6</sup> células/mL) se diluyen con 400  $\mu$ l de tampón isotónico a los que se añaden 3  $\mu$ l de JC-1 (1  $\mu$ M de concentración final). La mezcla es homogeneizada y se incuba durante 30 minutos a 38°C. Tras la incubación, la mezcla nuevamente es homogeneizada antes de su análisis en el citómetro de flujo. Los resultados se expresan como el porcentaje de espermatozoides con alto y con bajo potencial de membrana mitocondrial.



Citogramas que representan el potencial de membrana mitocondrial de la población espermática en estudio (tinción con JC-1). Citograma izquierdo, representación de la población en estudio. Citograma derecho, representación de la fluorescencia tanto de alto como de bajo potencial de membrana. Se observa un 72% de espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial

### **Evaluación del contenido de calcio intracelular**

Para evaluar el contenido de calcio intracelular en espermatozoides de verraco se ha usado la sonda Fluo3/AM (Axxora®, Alemania), en combinación con yoduro de propidio y HOESCHT-33342.

-Fluo3/AM presenta un máximo de emisión a 526 nm (FL1). Fluo3/AM no es fluorescente en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  pero su fluorescencia se incrementa sustancialmente cuando se une al calcio. Se utiliza en forma de acetometil éster (AM) que es permeable en la membrana celular de los espermatozoides. Una vez en el interior celular, Fluo3/AM necesita la acción hidrolítica de las esterasas endógenas para liberar el resto AM y así la sonda Fluo-3 queda libre para poder unirse al calcio intracelular.

-Hoescht-33342, fluorocromo que se excita con luz ultravioleta y tiñe el contenido nuclear (ADN) espermático. Emite a 486 nm y se usa para diferenciar los espermatozoides de las partículas de suciedad.

- Ioduro de Propidio (IP): componente B del kit de viabilidad espermática.

El protocolo experimental se base en que a 2 ml de una dosis seminal ( $20 \times 10^6$  espermatozoides/mL) se le añaden 2  $\mu\text{l}$  de una solución stock de Fluo-3/AM (1mM en DMSO) y se incuba durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Estos 2 ml de muestra previamente cargados con Fluo-3 se añaden sobre un gradiente de Percoll salino, que consiste en 4 mL de Percoll salino al 35% sobre 2 mL de Percoll salino al 70%. Las muestras se centrifugan durante 10 minutos a 300 g y 15 minutos a 750 g. Después de la centrifugación, el sobrenadante es aspirado y el sedimento se resuspende en TyrControl sin BSA (Tabla 4). Los espermatozoides cargados con Fluo-3 se mantienen en oscuridad a temperatura ambiente, analizándose en el citómetro de flujo en los 30 minutos siguientes. Para evaluar el contenido de calcio intracelular en semen de verraco en condiciones capacitantes una alícuota de 5  $\mu\text{l}$  de espermatozoides cargados con Fluo-3 se diluye en 995  $\mu\text{l}$  de

TyrBicCa, TyrCa o TyrControl (Tabla 4) que contiene IP (2,5 µg/mL concentración final) y Hoescht-33342 (0,75 µg/mL).

<b>CONCENTRACIÓN</b>			
<b>REACTIVOS</b>	<b>Tyr<sup>BicCa</sup></b>	<b>Tyr<sup>Ca</sup></b>	<b>Tyr<sup>Control</sup></b>
<b>NaCl</b>	96 mM	112 mM	111 mM
<b>HEPES</b>	20 mM	20 mM	20 mM
<b>Glucosa</b>	5 mM	5 mM	5 mM
<b>KCl</b>	3,1 mM	3,1 mM	3,1 mM
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	0,4 mM	0,4 mM	0,4 mM
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0,3 mM	0,3 mM	0,3 mM
<b>Piruvato sódico</b>	1 mM	1 mM	1 mM
<b>Lactato sódico</b>	21,7 mM	21,7 mM	21,7 mM
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	15 mM	-	-
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	2 mM	2 mM	-
<b>Na<sub>2</sub>-EGTA</b>	-	-	1 mM
<b>BSA</b>	3 mg/ml	3 mg/ml	3 mg/ml

Tabla 4: Composición de los diferentes medios de incubación para medir calcio intracelular

Los espermatozoides en un medio capacitante (TyrBicCa) se incuban a 38°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub> y los espermatozoides incubados en los medios no capacitantes (TyrControl y TyrCa) se incuban a 38°C en tubos cerrados herméticamente en un incubador sin CO<sub>2</sub>. Las muestras se incuban durante 3 y 60 minutos y se analizan en el citómetro de flujo DAKO Galaxy. El marcaje con yoduro de propidio diferencia los espermatozoides con la membrana plasmática alterada (IP<sup>+</sup>) de los que presentan la membrana plasmática intacta (IP<sup>-</sup>). La población espermática no teñida con yoduro de propidio fue dividida en dos subpoblaciones: i) células con baja intensidad de señal con Fluo-3 (espermatozoides vivos con bajo contenido en Ca<sup>2+</sup>: Fluo-3<sup>-</sup>/IP<sup>-</sup>) y ii) células con gran intensidad de señal con Fluo-3 (espermatozoides vivos con alto contenido en Ca<sup>2+</sup>: Fluo-3<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup>). Los cambios en las subpoblaciones entre los 3 y los 60 minutos de incubación en los distintos medios (TyrBicCa, TyrCa o TyrControl) reflejan la capacidad de respuesta de los espermatozoides a las condiciones capacitantes.

La respuesta fue calculada como los cambios que suceden durante ese intervalo de tiempo en la subpoblación de espermatozoides vivos con bajo contenido de calcio (Fluo-3<sup>-</sup>/IP<sup>-</sup>)  $\Delta = 60\text{min}-3\text{min}$ .



## WESTERN BLOTTING

El Western blotting es una técnica basada en la especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo que permite la identificación individual de proteínas entre una mezcla proteica más o menos compleja. En el presente trabajo se ha utilizado esta técnica para identificar la proteína AMPK, así como su estado de activación evaluado como su fosforilación en el residuo de Thr 172 (PThr172-AMPK) en lisados celulares de espermatozoides de verracos. El protocolo seguido se describe a continuación:

### **Obtención de lisados de espermatozoides**

Para la extracción de las proteínas los espermatozoides ( $180 \times 10^6$  espermatozoides totales), incubados bajo diferentes tratamientos y condiciones, son centrifugados durante 20 segundos a 7.000 g y posteriormente lavados en tampón fosfato salino (PBS, Tabla 5) con  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (0,2mM ). Al precipitado así obtenido se le añade tampón de lisis (Tabla 6), que contiene un inhibidor de proteasas (Complete, EDTA-free, Roche®, solución stock 1 pastilla/1ml agua), seguidamente se sonica durante 5 segundos a 4°C, y se mantiene en agitación constante durante 20 minutos a 4°C para facilitar la acción de los detergentes. Posteriormente las muestras se centrifugan a 10.000 g (15 minutos a 4°C), con la finalidad de separar la fracción celular insoluble (principalmente el citoesqueleto y proteínas asociadas) de la fracción soluble, y se recoge el sobrenadante que constituye el lisado de espermatozoides. En este último se determina la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (BIO RAD®PROTEIN ASSAY). A los lisados se les añade tampón de carga 4X (Tabla7) y se conservan a -80 °C hasta el día de su uso.

### **Electroforesis SDS-PAGE**

La electroforesis es una técnica eficaz para la separación y análisis de las proteínas que se encuentran en muestras biológicas. Se basa en la capacidad de migración de las proteínas cargadas cuando se ven sometidas a un campo eléctrico.

Las proteínas espermáticas se separaron mediante una electroforesis en condiciones desnaturizantes del tipo SDS-PAGE. Para ello las proteínas fueron tratadas con SDS antes de la electroforesis, con lo que conseguimos su desnaturalización, ya que todas las proteínas en presencia de SDS presentan carga neta negativa de manera que éstas migran exclusivamente en función de su peso molecular (tamaño).

<b>REACTIVOS</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
<b>NaCl</b>	137 mM
<b>KCl</b>	2,7mM
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	5,62 mM
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	1,09mM
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	1,47 mM

Tabla 5: Composición del tampón fosfato salino (PBS). pH= 7,4

<b>REACTIVOS</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
<b>Tris/HCl (pH 7,5)</b>	50 mM
<b>NaCl</b>	150 mM
<b>Triton X-100</b>	1% v/v
<b>Desoxicolato</b>	1% w/v
<b>EDTA</b>	0,4 mM
<b>EGTA</b>	1 mM
<b>Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub></b>	0,2 mM
<b>PMSF</b>	1,0 mM
<b>Inhibidores de proteasas</b>	10µl/1ml

Tabla 6: Composición del tampón de lisis. pH= 7,4

La electroforesis de proteínas SDS-PAGE se realiza en un soporte que es un gel discontinuo de poliacrilamida, constituido por dos geles diferentes:

**-gel de carga o acumulador:** se encuentra en la parte superior y contiene un porcentaje del 4% de poliacrilamida y un pH 6,8 (Tabla 8). Este gel tiene bajo poder separador, pero con él se consigue que todas las proteínas presentes en una muestra se concentren en una banda.

**-gel separador:** se encuentra en la parte inferior, contiene un 10 % de poliacrilamida (idóneo para las proteínas de estudio, AMPK y GSK3) y un pH 8,8 (Tabla 8). Este gel consigue separar las proteínas de una muestra en función de su peso molecular.

Previo a su carga en el gel, los lisados a los que se ha añadido el tampón de carga se calientan a 95°C durante 5 minutos. Tras el calentamiento se centrifugan a 7.200 g durante 30 segundos y el volumen determinado de sobrenadante que contiene 20 µg de proteínas se carga directamente en el gel de carga.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN
Tris/HCl (pH 6,8)	0,4 M
DTT (ditiotreitól)	0,4 M
SDS	8% w/v
Glicerol	20% v/v
Azul de bromofenol	0,02% w/v
2-mercaptoetanol	10% v/v

Tabla 7: Composición del tampón de carga 4X

REACTIVOS	GEL DE CARGA 4%	GEL SEPARADOR 10%
ACRILAMIDA	4% v/v	10% v/v
TRIS/HCl (Ph 8,8)	375 mM	375 mM
TEMED	0,1% v/v	0,05% v/v
APS	0,05% v/v	0,05% v/v
SDS	0,05% v/v	0,05% v/v

Tabla 8: Composición de los geles de poliacrilamida

La electroforesis se realiza en una cubeta XCell™ MiniCell (Invitrogen®), en presencia de un campo eléctrico con un voltaje constante de 90 mV y 145 mV en el gel de carga y en el de separación, respectivamente. Para ello usamos la fuente PowerPac300, de Bio-Rad®.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN
Tris HCl (Ph 8,3)	2,5 mM
Glicina	19,2 mM
SDS	0,01% w/v

Tabla 9: Composición del tampón de electroforesis

Al menos en una de las calles del gel se corre un estándar de proteínas teñidas con peso molecular conocido, que posteriormente servirá como patrón de

referencia para conocer la movilidad electroforética de las proteínas objeto de estudio (SeeBlue® Pre-Stained Standard y SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen®).

### **Electrotransferencia**

La electrotransferencia consiste en el traspaso de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a otro tipo de soporte, en este caso a membranas de nitrocelulosa (tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ ), mediante la aplicación de un campo eléctrico. Para ello se coloca en un soporte denominado *sándwich* y en este orden: (ánodo) papel de filtro, el gel que contiene las proteínas, la membrana de nitrocelulosa y papel de filtro (cátodo). Como la electrotransferencia que se ha realizado en esta Tesis ha sido en “húmedo”, todos estos pasos se realizan siempre en condiciones de humedad, con todos los componentes embebidos en tampón de transferencia (Tabla 10). El *sándwich* se coloca en una cubeta de transferencia (Mighty Small Transphor, de Hoefer) y se rellena con el tampón. El gel queda orientado hacia el ánodo y la membrana hacia el cátodo, ya que la migración de las proteínas se produce desde el ánodo al cátodo. La electrotransferencia se realiza sometiendo a las proteínas a un campo eléctrico con un amperaje constante de 380 mA durante 3 horas, condiciones óptimas para las proteínas de estudio, determinadas por nuestro grupo de investigación.

<b>REACTIVOS</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
<b>TrisHCl (pH 8,3)</b>	2,5 mM
<b>Glicina</b>	19,2 mM
<b>Metanol</b>	20% v/v

Tabla 10: Composición del tampón de transferencia

### **Bloqueo de las uniones inespecíficas**

Una vez transferidas las proteínas a las membranas de nitrocelulosa, y con el objetivo de impedir las uniones inespecíficas del anticuerpo a la superficie de la membrana, se realiza el denominado bloqueo. Este consiste en incubar la membrana en un tampón adecuado (Tabla 11) en agitación constante y suave durante 1 h a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4°C. En el tampón de bloqueo se incluye un detergente que mejora el bloqueo y reduce la unión inespecífica (Tween al 0,05% v/v).

<b>REACTIVOS</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
<b>TrisHCl (pH 8,0)</b>	50 mM
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	2 mM
<b>NaCl</b>	80 mM
<b>Tween 20</b>	0,05% v/v
<b>Leche desnatada en polvo</b>	5% w/v

Tabla 11: Composición del tampón de bloqueo

### **Inmunoblotting: incubación con el anticuerpo primario**

El siguiente paso consiste en la incubación de la membrana con el anticuerpo específico que reconoce a la proteína en estudio, que variará dependiendo del anticuerpo primario utilizado. Para ello, se incuba la membrana de nitrocelulosa con el anticuerpo específico primario en agitación constante y diluido en tampón de bloqueo según las condiciones especificadas en la Tabla 12. Después de la incubación con el anticuerpo primario las membranas se lavan 2 veces durante 10 minutos en agitación constante con el tampón de bloqueo, consiguiendo así

eliminar el exceso de anticuerpo primario que no se ha unido a la membrana. Tras el lavado se incuban las membranas durante 45 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-conejo (Tabla 12) que reconoce de manera específica al anticuerpo de conejo utilizado como primario. El anticuerpo secundario está conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP). Tras la incubación con el anticuerpo secundario se lavan de nuevo dos veces las membranas durante 10 min en tampón de bloqueo y dos veces más durante 10 min en tampón de lavado (Tabla 13) a temperatura ambiente y en agitación constante.

Anticuerpo	Compañía	Especie	Dilución	Incubación	Temperatura
Anti AMPK- $\alpha$	Santa Cruz	Conejo	1:1000	Toda la noche	4°C
Anti-PThr172-AMPK	Cell Signaling	Conejo	1:500	Toda la noche	4°C
GSK3 $\beta$	Cell Signaling	Conejo	1:2000	2 horas	Tª ambiente
Anti-conejo-IgG	Life Technologies	Cabra	1:15000/1:200	45 minutos/1 hora	Tª ambiente

Tabla 12: Información sobre los distintos anticuerpos usados

### **Detección de la proteína por quimioluminiscencia**

Para la detección de la proteína de estudio, la membrana se incubaba durante 5 minutos con una solución 1:1 que contiene un sustrato de la peroxidasa y luminol (Supersignal West Pico Stable Peroxide Solution, ThermoScientific®, USA o Supersignal West Femto Lumino/Enhancer Solution, ThermoScientific®, USA). La liberación de energía en forma de fotones del luminol en un estado excitado, inducido por productos de la reacción de la peroxidasa, provoca quimioluminiscencia que es fácilmente detectable al exponer la membrana a una película fotosensible (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare®). El tiempo de exposición de la película depende de la quimioluminiscencia generada por cada anticuerpo en unas condiciones experimentales. Una vez expuesta la película se



procede al revelado de la misma: la película se incuba un mínimo de 2 minutos en agitación suave en una solución de revelado (Carestream® Kodak® autoradiography GBX developer/replenisher, SIGMA), se lava en agua y finalmente se incuba durante 1 minuto en una solución de fijación (Carestream® Kodak® autoradiography GBX fixer/replenisher, SIGMA). Posteriormente se procede al análisis de la señal o banda obtenida mediante el escaneo de la película y la cuantificación de la banda correspondiente con el programa FUJIFILM BAS V2.2 para MAC.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN
TrisHCl (pH 8,0)	50 mM
CaCl <sub>2</sub>	2 mM
NaCl	80 mM
Tween 20	0,05% vv/v

Tabla 13: Composición del tampón de lavado

## **INMUNOLocalIZACIÓN DE LA PROTEÍNA AMPK-ALFA EN ESPERMATÓZOIDES DE CERDO POR INMUNOFLORESCENCIA**

Para la inmunolocalización de la proteína AMPK $\alpha$  en espermatozoides de verraco usamos la técnica de inmunofluorescencia. Para ello una alícuota de la muestra ( $80 \times 10^6$  espermatozoides/ml) se fija previamente durante 4 minutos en paraformaldehído al 4%; 40  $\mu$ l de los espermatozoides fijados se depositan en un portaobjetos tratado con poli-L-lisina (Electron Microscopy Sciences<sup>®</sup>, USA), se dejan secar al aire y se lavan 3 veces en PBS (5 minutos por lavado). Los espermatozoides se permeabilizan con 0,25% Triton X-100 (vol/vol), pH 7,4 durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras la permeabilización, las células se lavan 3 veces con PBS (5 minutos por lavado) y se procede a bloquear las uniones inespecíficas incubando las muestras en PBS con 0,1% (vol/vol) de Tween-20 y 1% (peso/vol) de BSA durante 30 minutos a temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo primario, anti-AMPK $\alpha$  (1:100) diluido en la solución de bloqueo, se realiza durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación con el anticuerpo primario las muestras se lavan 3 veces con PBS (5 minutos por lavado) y se incuban con el anticuerpo secundario anti-conejo-IgG ligado a una sonda fluorescente Alexa Flúor 488 (Life Technologies Ltd., Grand Island, NY, USA) (1:200) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Como control negativo, incubamos una muestra con el anticuerpo secundario omitiendo el anticuerpo primario. Finalmente, las muestras se lavan con PBS y son incubadas con 5  $\mu$ l (125 ng/mL) de una solución comercial de 4.6-diamidino-2-fenilindol hidrocloreto (DAPI, Life Technologies Ltd<sup>®</sup>, Grand Island, NY, USA), sonda que tiñe los núcleos y contiene una solución de montaje protectora de la fluorescencia. Cualquier exceso de líquido se elimina y la preparación se monta con un cubreobjetos, que es sellado con esmalte de uñas incoloro y almacenado a 4°C en oscuridad hasta el momento de su análisis. Las imágenes de fluorescencia emitida fueron obtenidas con un microscopio de fluorescencia confocal (Fluoview FV1000; Olympus, Tokyo, Japan). Las imágenes fueron

capturadas con el programa informático Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF) (Leica Microsystems S.L.U., Barcelona, España). Finalmente las imágenes obtenidas fueron procesadas mediante el programa informático Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems, Mountain View, CA).

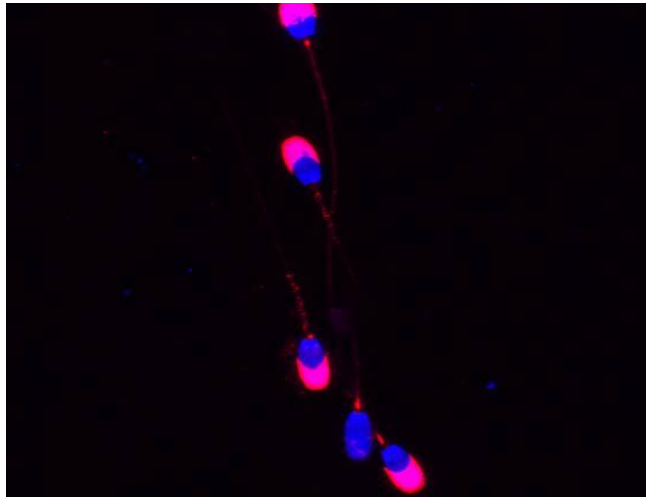


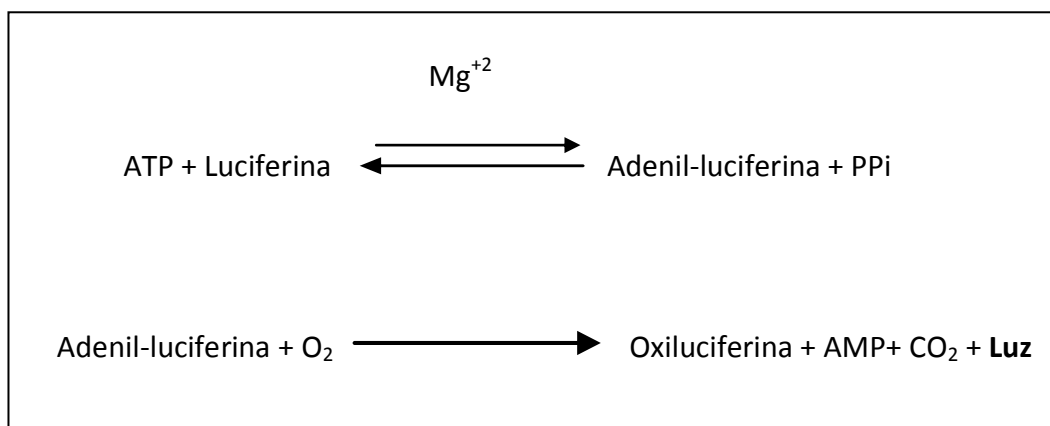
Imagen de la inmunolocalización de la proteína AMPK- $\alpha$  en espermatozoides de cerdo

## **CUANTIFICACIÓN DEL NIVEL CELULAR DE ATP**

La determinación del contenido celular de ATP se realizó en las dosis seminales conservadas a 17°C o con dosis seminales conservadas a 17°C y posteriormente incubadas durante 40 minutos a 38,5°C y 5% CO<sub>2</sub>. A 100 µl de cada muestra se le añade 1 µl de un inhibidor de fosfatasas (Cocktail inhibidor de proteasas2-Sigma®) y se incuba la mezcla 30 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual la muestra espermática es congelada y almacenada a -20°C. El contenido de ATP en los espermatozoides fue medido siguiendo el protocolo descrito por Long and Guthrie (2006). Sobre las muestras almacenadas a -20°C se añaden 900 µL del tampón de ebullición (Tabla 14) previamente calentado a 95°C y las muestras se mantienen a esta temperatura durante 10 minutos. Posteriormente son enfriadas en hielo durante 10 minutos y centrifugadas a 5.000 g durante 30 minutos a 4°C. El contenido de ATP se determina con un kit comercial (ATP kit de bioluminiscencia FL-AAM, Sigma®, Alemania) siguiendo la instrucciones del fabricante. A 25 µl del sobrenadante se le añaden 75 µl del tampón del kit de cuantificación que desencadena la reacción de luminiscencia pues contiene luciferasa. Rápidamente se procede a la lectura de la bioluminiscencia en una placa de 96 pocillos (Greiner Bio One 96 Well Cellstar®), utilizando el lector SpectraFluor Plus (Tecan Group Ltd®, Maennedorf, Suiza). Además, se realiza una curva patrón con el estándar proporcionado por el Kit para poder cuantificar la señal producida. La bioluminiscencia producida es proporcional a la cantidad de ATP presente en las muestras.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN
Tricine	50mM
MgSO <sub>4</sub>	10mM
EDTA	2mM

Tabla 14: Composición del tampón de ebullición. pH = 7,8



Esquema de la reacción de bioluminiscencia

# **Discusión**

---



Uno de los mayores avances en la Biotecnología de la Reproducción porcina ha sido la implantación de la Inseminación Artificial utilizando dosis seminales comerciales conservadas a 17-20 °C como técnica de rutina en los centros de cría y producción porcina de todo el mundo. Con esta tecnología se ha conseguido por un lado, aumentar el rendimiento reproductivo de una cerda al estar más controlada (celo, ovulación, gestación, parto, etc) y por otro, disminuir los costes de mantenimiento de un elevado número de machos, ya que con la IA necesitamos menos machos por número de hembras a inseminar. Además, se ha conseguido una rápida diseminación del material genético de alta calidad, obteniendo como resultado una población ganadera más competitiva. Aunque esta tecnología está muy instaurada en el sistema de producción porcina mundial, la conservación del eyaculado diluido a 17°C produce una merma en su capacidad fecundante, en parte debida a la respuesta de los espermatozoides porcinos a la conservación en refrigeración. A pesar del alto rendimiento encontrado en la utilización del semen refrigerado, se ha observado una pérdida de la fertilidad de las dosis seminales a lo largo del periodo de conservación, acentuándose a partir del cuarto día de conservación a 17°C (revisado por Gadea 2003; Johnson y cols., 2000). Está ampliamente demostrado que durante la conservación a 17°C el espermatozoide de cerdo sufre cambios funcionales que incluyen, entre otros, una disminución de la motilidad y la viabilidad, junto con alteraciones en la permeabilidad e integridad de las membranas plasmática y acrosomal (Conejo-Nava y cols., 2003; Waterhouse y cols., 2004). Esta pérdida de la capacidad fecundante que se produce durante la conservación mediante refrigeración podría estar relacionada con la composición lipídica de la membrana del espermatozoide de cerdo, que contiene una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (Awda y cols., 2009; Kadirvel y cols., 2009; Kumaresan y cols., 2009). Es por ello que las investigaciones que buscan la mejora de la conservación de espermatozoides porcinos mediante refrigeración y el aumento la fertilidad de las dosis seminales, tienen un impacto importante en la biotecnología de la reproducción porcina.



El diluyente utilizado para la conservación del semen porcino mediante refrigeración es uno de los principales factores que influyen en los espermatozoides para mantener su capacidad fecundante durante un tiempo más o menos prolongado. Pese a que se han descrito diferencias entre razas en la calidad seminal (Conlon y Kennedy, 1978; Kennedy y Wilkins, 1984) no se conoce realmente si la capacidad de conservación de un diluyente en particular varía en función de la raza de verraco utilizada, o si hay diferencias entre diluyentes en la capacidad de conservación para una raza dada. Es por ello que nos planteamos el estudio de la variabilidad intra y entre razas de los parámetros de motilidad objetiva y de viabilidad espermática en eyaculados de cerdo de dos razas ampliamente distribuidas en nuestra región, Ibérica y Duroc, y en dos diluyentes comerciales de uso habitual, MRA y X-Cell. La motilidad es uno de los parámetros de la función espermática directamente relacionados con la calidad seminal y que se modifica durante la refrigeración a largo plazo, por lo que se utiliza como referencia en este tipo de estudios. Además, diversos parámetros de motilidad objetiva, medida mediante el sistema CASA, han sido correlacionados con la fertilidad del macho, como así lo pone de manifiesto el reciente estudio de Broekhuijsen y cols. (2012), quienes propusieron el uso del sistema CASA como una herramienta de gran valor para la selección de los eyaculados de cerdo de mejor calidad. La mayor parte de los estudios que han evaluado el efecto del diluyente y del tiempo de conservación en la motilidad espermática lo han hecho mediante el análisis de la motilidad subjetiva, frente a la evaluación objetiva utilizada en este estudio. La integridad de la membrana plasmática es un requisito indispensable para un óptimo metabolismo y funcionalidad espermática, así como para el mantenimiento de la viabilidad durante el periodo de conservación (Dubé y cols., 2004; Waberski y cols., 2011). Su medición por citometría de flujo aporta además fiabilidad, objetividad y reproducibilidad a los resultados obtenidos (Waterhouse y cols., 2004).

En nuestro estudio hemos observado que, para cada raza, la tolerancia de los espermatozoides a la conservación durante 7 días, en términos de preservación de la motilidad espermática, fue diferente en función del diluyente utilizado. Este

efecto fue más acusado en el caso de la raza Ibérica, tanto por el número de parámetros de motilidad modificados como por la magnitud de las diferencias observadas en estos parámetros entre los diluyentes. Los resultados de variabilidad de los dos diluyentes estudiados en la tolerancia a la conservación para cada una de las razas, indican un comportamiento de cada diluyentes diferencial en su interacción con el semen en cada una de las razas: 1) para cada uno de los diluyentes evaluados se observaron diferencias significativas entre las razas Duroc e Ibérica en los parámetros de motilidad en los diferentes días de conservación; 2) salvo para el porcentaje de espermatozoides móviles los días 1 y 4 en MRA, los valores de los parámetros de motilidad fueron superiores en la raza Ibérica; 3) la magnitud de las diferencias entre razas se modificó por el diluyente utilizado; así, salvo para el porcentaje de espermatozoides móviles, las diferencias fueron superiores en el diluyente X-Cell. En definitiva, estos resultados apoyan la idea de adaptar cada diluyente a cada raza en particular. Así, y como resultados a destacar de este estudio, en términos de mayor motilidad progresiva podríamos decir que el diluyente más indicado para la raza Ibérica sería el X-Cell y que la magnitud de las diferencias entre razas pueden variar en función del diluyente utilizado.

Como se ha comentado con anterioridad, pese a que se han observado diferencias entre razas en la calidad seminal, por lo general, la mayor parte de los estudios en los que se comparan diluyentes utilizan varias razas, razas híbridas o incluso no se hace referencia a la raza o razas en estudio (De Ambroggi y cols., 2006; Estienne y cols., 2007; Kuster y Althouse, 1999). A raíz de nuestros resultados podemos considerar que la raza es un factor de variación más a tener en cuenta en la capacidad de diferentes diluyentes para preservar la motilidad durante la conservación. Por ello, y desde un punto de vista práctico, los estudios cuyo objetivo sea comparar las características seminales de varias razas, han de tener en cuenta que los resultados pueden estar modificados por el diluyente utilizado y que éste, por tanto, debe ser especificado en el estudio. Este aspecto también debe ser considerado cuando se evalúa el efecto de diferentes tratamientos en las características de motilidad espermática. Estos estudios deberían ser realizados en

una raza y con un diluyente concreto. Esto resulta de interés cuando han de compararse estudios de diferentes equipos de investigación. De hecho, hemos observado diferencias en los resultados obtenidos por diversos estudios en los que se comparan los mismos diluyentes, pero no utilizan las mismas razas (De Ambrogi y cols., 2006; Estienne y cols., 2007). Es necesario, por tanto, una estandarización de las condiciones experimentales en las que se realizan este tipo de estudios. En virtud de la variabilidad observada entre diluyentes para una raza concreta, podemos recomendar también que los estudios que se planteen comparar la eficacia de varios diluyentes durante la conservación lo hagan en una raza en concreto. Por último, Lewis (2000) y Gadea (2003) indicaron que los diluyentes deben incluso adaptarse a cada macho en particular. Así, se ha observado que el macho es otra fuente de variación en la tolerancia de los espermatozoides de verraco a la conservación mediante refrigeración (Waberski y cols., 1994; Waterhouse y cols., 2004), resultado que también ha sido observado en nuestro trabajo, especialmente en machos de la raza Ibérica. Todo parece indicar que esta variación entre individuos obedece a diferencias genéticas que se manifiestan en distintas características funcionales, tanto de la célula germinal como del plasma seminal (Kommisrud y cols., 2002; Waterhouse y cols., 2004).

La composición de los distintos diluyentes, comerciales o no, incluyen componentes básicos como son: una fuente de energía (generalmente glucosa), un sistema tampón que mantiene el pH de forma adecuada, una osmolaridad dentro un rango fisiológico y antibióticos. Además, presentan una serie de componentes diferenciales entre diluyentes con el fin de incrementar durante el mayor tiempo posible la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos, conservados diluidos y por refrigeración. Entre estos componentes presentes de forma habitual en los diluyentes comerciales podemos citar la trehalosa, la cisteína, el ácido cítrico, la BSA o el acetato potásico (Gadea, 2003).

Actualmente existen nuevas vías de investigación con el objetivo de mejorar la fertilidad de las dosis seminales porcinas, como son:

1) El diseño de diluyentes que encapsulan los espermatozoides (Vigo y cols., 2009) y que les permite liberarse lentamente en el tracto reproductivo de la hembra.

2) Se ha sugerido que la disminución de la fertilidad que se observa durante la conservación de los espermatozoides por largos periodos podría ser debida a un daño oxidativo provocado por una inapropiada formación de especies reactivas de oxígeno, que conlleva una peroxidación lipídica de las membranas. De hecho, este daño oxidativo podría estar exacerbado debido a la baja capacidad antioxidante del plasma seminal del verraco (Awda y cols., 2009; Cerolini y cols., 2000; Guthrie y Welch, 2008). Es por este motivo por lo que surgió un enorme interés en el empleo de sustancias antioxidantes en el semen de cerdo, como la superóxido dismutasa, la catalasa (Roca y cols., 2005), el  $\alpha$ -tocoferol (Cerolini y cols., 2000) y la L-Glutamina (Funahashi y Sano, 2005).

3) Otra línea de investigación consiste en la modificación del estado funcional del espermatozoide. En este sentido se han usado la cafeína (Yamaguchi y cols., 2009) y la hormona oxitocina (Okazaki y cols., 2013) con éxito, al aumentar la fertilidad de las dosis seminales.

4) Se ha demostrado que la movilidad de los espermatozoides de toros se ve afectada por la viscosidad (Hirai y cols., 1997). Este aumento de la viscosidad se ha probado en cerdo con la adición de gelatinas al diluyente BTS, obteniendo un mayor porcentaje de espermatozoides móviles y espermatozoides con movilidad progresiva en la conservación de dosis seminales tratadas con gelatinas frente al diluyente control (Gil y cols., 2008).

5) Otra posible aproximación es la modificación de la temperatura de conservación, con el objetivo de disminuir la contaminación bacteriana (Johnson y cols., 2000).

La adición de melatonina o resveratrol a dosis seminales de verraco se puede incluir en el estudio del efecto tanto de la modificación de las vías

intracelulares reguladoras de la función del espermatozoide como de la protección frente a un incremento de la presencia de ROS. El empleo de ambas sustancias ha presentado efectos beneficiosos en el mantenimiento de la calidad de los espermatozoides y en la conservación del semen de varias especies: humano (Branco y cols., 2010; Collodel y cols., 2011), ratas (Juan y cols., 2005; Ourique y cols., 2013), carneros (Silva y cols., 2012) y caballos (da Silva y cols., 2011). Nuestro objetivo ha sido comprobar si estos efectos beneficiosos podrían reproducirse en la especie porcina mejorando la calidad de los espermatozoides conservados a largo plazo a 17°C.

Es preciso recordar que la melatonina es una molécula producida mayoritariamente por la glándula pineal y cuya presencia se ha descrito en plasma seminal humano (Luboshitzky y cols., 2002). Además, se ha demostrado la presencia de receptores de esta molécula en espermatozoides humanos (van Vuuren y cols., 1992), de carnero (Casao y cols., 2012) y de hámster (Fujinoki, 2008), pero no se han encontrado evidencias de su presencia en espermatozoides de caballo (da Silva y cols., 2011) ni de cerdo. Por otra parte, el resveratrol es un polifenol natural con efectos pleiotrópicos, entre los que se incluyen un efecto anticancerígeno, antiedad, antiinflamatorio, antioxidante, y propiedades cardioprotectoras y neuroprotectoras (Fulda y cols., 2010; Pervaiz y Holme, 2009). Ambas sustancias presentan algunas características comunes que nos gustaría destacar: i) se ha demostrado que tanto la melatonina (Peyrot y Ducrocq, 2008; Tan y cols., 2007) como el resveratrol (Kasdallah-Grissa y cols., 2006) reducen los niveles de  $O_2^-$  y aniones nitritos capturando radicales peróxilos y/o  $OH^-$ , donando el electrón de hidrógeno a su grupo hidroxilo. ii) Además, ambos ejercen su acción en las mitocondrias. Así, la melatonina se acumula en grandes concentraciones en la mitocondria donde interacciona con enzimas del complejo I y IV (Acuna-Castroviejo y cols., 2001; Leon y cols., 2004). Por otra parte, el resveratrol, regula la permeabilidad de los poros de transición mitocondrial (Zunino y Storms, 2006), aumenta la producción de superóxidos mitocondriales (Low y cols., 2010), disminuye el potencial de membrana mitocondrial (Sareen y cols., 2006; van Ginkel y cols., 2007) y rompe la

cadena respiratoria mitocondrial (Zheng y Ramirez, 2000; Zini y cols., 1999). Finalmente, es interesante destacar que ambas moléculas han sido usadas como agentes terapéuticos en el tratamiento y control de procesos oncogénicos y tumorales (Aziz y cols., 2003b; Blask y cols., 2002; Lin y cols., 2012; Reiter, 2003).

En nuestro trabajo, la adición de melatonina 1  $\mu\text{M}$  produjo un incremento de los parámetros de velocidad espermática sólo en el día 1 de conservación; por el contrario, los menores valores se obtuvieron para muestras tratadas en el día 7, momento en el que también se observó el menor porcentaje de espermatozoides móviles para muestras tratadas. Las mayores velocidades obtenidas el día 1 podrían indicar un efecto inmediato de la melatonina a través de su receptor específico, mientras que el efecto negativo a lo largo del tiempo de conservación podría ser mediado por una depleción de ROS. Este efecto negativo de la melatonina en la motilidad espermática ha sido observado también por otros investigadores (Gwayi y Bernard, 2002; Irez y cols., 1992; Sliwa y Stochmal, 2001). Destacamos también los menores índices de linealidad a lo largo de todo el tiempo de conservación en las muestras tratadas con melatonina. Al efecto negativo de la melatonina en la motilidad hemos de añadirle el efecto negativo en la viabilidad, especialmente en el día 7 de conservación. Sin embargo, el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma dañado fue inferior en dosis seminales tratadas con melatonina, lo que supone un efecto beneficioso en la conservación de estas dosis seminales. Este efecto es importante destacarlo, ya que se ha descrito que durante la conservación de dosis seminales de verraco mediante refrigeración aumenta el número de espermatozoides prematuramente capacitados y reaccionados (Conejo-Nava y cols., 2003; Huo y cols., 2002; Kumaresan y cols., 2009),

Asimismo nuestro estudio muestra un efecto dicotómico del resveratrol; así, a bajas concentraciones (10-33  $\mu\text{M}$ ) no se observaron efectos ni en la motilidad, ni en la desorganización de los fosfolípidos de la membrana espermática. Con las concentraciones más altas (66-100  $\mu\text{M}$ ) se produjo una disminución de las velocidades y del porcentaje de espermatozoides móviles, sin afectar a la linealidad,

al contrario de lo observado con el tratamiento con melatonina, que produjo un descenso de la linealidad. Tampoco se vio afectada la viabilidad espermática, a diferencia de lo observado con melatonina en nuestro trabajo. En la especie humana, otros investigadores han indicado una mortalidad del 100% de los espermatozoides al usar una concentración de resveratrol de 100  $\mu$ M (Collodel y cols., 2011).

La melatonina es una molécula lipofílica que atraviesa fácilmente las membranas celulares, alcanzando los compartimentos subcelulares, como la mitocondria. Se ha descrito que un posible efecto de la actividad de la melatonina en la mitocondria podría ser un aumento en la producción de ATP (Martin y cols., 2000). En nuestro estudio hemos de destacar que, pese al descenso en el porcentaje de espermatozoides viables y de espermatozoides móviles a lo largo del periodo de conservación, no se observó paralelamente un descenso en el potencial de membrana mitocondrial en dosis seminales tratadas con melatonina. Es posible que el incremento en la velocidad observado en el día 1 sea debido al incremento en la producción de ATP, pero el rápido descenso en los valores de motilidad al día 7 apunta hacia un mecanismo no dependiente de la mitocondria. En definitiva, nuestros resultados no muestran un claro efecto de la melatonina en las mitocondrias de los espermatozoides de cerdo, y pensamos que el efecto observado en la motilidad puede obedecer al papel de la melatonina como modulador de la reorganización del citoesqueleto, efecto que por otro lado es dependiente de la dosis (Benitez-King, 2006; Benitez-King y Anton-Tay, 1993; Huerto-Delgadillo y cols., 1994). Sin embargo la adición de resveratrol a dosis seminales de cerdo produjo una disminución del potencial de membrana mitocondrial durante los 7 días de conservación con cualquier dosis usada, que está en consonancia con resultados obtenidos en células somáticas (Sareen y cols., 2006; van Ginkel y cols., 2007). Considerando el efecto negativo del resveratrol en el potencial de membrana mitocondrial nos planteamos si este polifenol natural afecta a la concentración de ATP de los espermatozoides de dosis seminales de cerdo conservadas mediante refrigeración. La cuantificación de la concentración de

ATP en espermatozoides de cerdo se ha realizado durante una estancia investigadora en el laboratorio de la Doctora Waberski, en la Facultad de Medicina Veterinaria de Hannover (Alemania). Nuestros resultados revelan que en las dosis seminales tratadas con resveratrol disminuye el contenido celular de ATP de 3 a 20 veces en comparación con la muestra sin tratar, en función de la dosis de resveratrol usada (33 ó 100  $\mu\text{M}$ ). La hidrólisis del ATP es necesaria para que las dineínas que se encuentran en el axonema puedan desempeñar su función en la motilidad (Tash, 1989). En nuestro estudio, la disminución observada en el potencial de membrana mitocondrial en los espermatozoides de dosis seminales porcinas tratadas con resveratrol fue paralela a la disminución en la concentración de ATP. Este efecto deletéreo del resveratrol en las mitocondrias espermáticas junto al de la concentración de ATP podría explicar el descenso de la motilidad en espermatozoides tratados con resveratrol. En este sentido, se ha obtenido una correlación positiva entre el contenido de ATP espermático y el porcentaje de espermatozoides móviles, así como entre el contenido de ATP y las velocidades espermáticas (VCL, VAP y VSL).

La bibliografía describe efectos positivos de la melatonina en espermatozoides de cerdos incubados en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Jang y cols., 2010), un efecto protector frente al mercurio en espermatozoides de ratas (Rao y Gangadharan, 2008), una disminución de las ROS en espermatozoides sometidos a centrifugación (Aitken y Clarkson, 1988) y un efecto activador de la motilidad de espermatozoides humanos (Gulay y Aysekendiracy, 1996). Por el contrario, diversos estudios describen efectos negativos en la motilidad de espermatozoides de rata cuando no son sometidos a condiciones estresantes (Gwayi y Bernard, 2002), y lo mismo sucede en la motilidad de espermatozoides humanos que no son sometidos a ningún estrés (Irez y cols., 1992). En espermatozoides de ciervo rojo descongelados, la adición de melatonina (0,1mM) no tuvo ningún efecto en la motilidad en ausencia de un estrés oxidativo exógeno (Dominguez-Rebolledo y cols., 2010).



Con respecto al resveratrol, también se han descrito efectos positivos tras la criopreservación de espermatozoides humanos, al disminuir la peroxidación lipídica y el daño en el ADN (Branco y cols., 2010; Garcez y cols., 2010). No obstante, se produjo una merma en la motilidad, lo que coincide con los resultados de Collodel y cols. (2011), también en espermatozoides humanos, y con los descritos en nuestro estudio en espermatozoides de cerdo. Nuestros resultados están, además, en consonancia con los obtenidos por Silva y cols. (2012) estudiando la conservación de espermatozoides de carnero, donde el resveratrol no tuvo ningún efecto en la motilidad pero, sin embargo, produjo una reducción del potencial de membrana mitocondrial. El efecto negativo del resveratrol en el potencial de membrana mitocondrial ha sido descrito en células somáticas; así por ejemplo, se ha usado en el tratamiento del carcinoma de vejiga al reducir el potencial de membrana mitocondrial y los niveles de ATP (Lin y cols., 2012).

La susceptibilidad de los espermatozoides de cerdo al shock por frío se ha relacionado con la composición lipídica de la membrana plasmática, la cual contiene una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (Awda y cols., 2009; Kadirvel y cols., 2009; Kumaresan y cols., 2009), que los haría por tanto más sensibles a la peroxidación lipídica. Se ha propuesto que la disminución de la capacidad fecundante de los espermatozoides tras la eyaculación está relacionada con la presencia de ROS (Cordoba y cols., 2009). Por ello, hubiera sido lógico esperar que, tanto la melatonina como el resveratrol, definidas como moléculas captadoras de ROS, tuvieran un efecto positivo en la conservación mediante refrigeración de las dosis seminales de cerdo. Sin embargo, cuando se ha medido la peroxidación lipídica de dosis seminales de verraco conservadas mediante refrigeración durante 5 días se ha observado que esta peroxidación lipídica era baja (Fuhrmann y cols., 1991), al igual que el contenido en ROS en espermatozoides de cerdo (Guthrie y Welch, 2006). Existen, por lo tanto, evidencias que sugieren que las ROS no son la principal causa de la pérdida de calidad de los espermatozoides porcinos durante su conservación mediante refrigeración. Guthrie y Welch (2012), en un artículo de gran calidad, describen cómo las técnicas para detectar la presencia de ROS son poco

específicas, ya que están basadas en técnicas quimioluminiscentes (Fridovich, 1997; Fridovich, 2003). La peroxidación lipídica de membranas se ha determinado por la formación de malondialdéhido (MDA) (Fridovich, 1997), un producto derivado de la oxidación del ácido araquidónico (Spiteller, 2006b). Ambos protocolos, tanto el usado para medir ROS como el usado para detectar MDA, tienen la desventaja de no distinguir entre células vivas y muertas, y por lo tanto no proporcionan una adecuada estimación de las células vivas que producen ROS o el porcentaje de células vivas en las que se ha producido la peroxidación lipídica. Además, estos autores sugieren que la formación de ROS y la posterior peroxidación lipídica podrían ocurrir sólo en una pequeña proporción de espermatozoides o sólo en aquellas células no viables. Como alternativa a estos métodos se ha desarrollado un procedimiento para identificar ROS en espermatozoides viables mediante la tinción con hidroetidina (HE) y diacetato 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA), para detectar anión superóxido y peróxidos de hidrógeno (Guthrie y Welch, 2006), mediante citometría de flujo. Para la detección de la peroxidación lipídica en células viables se ha utilizado el fluorocromo BODIPY (Guthrie y Welch, 2007). Con el uso de estas nuevas técnicas de citometría, comparando muestras seminales de cerdo en presencia o ausencia de un sistema generador de ROS (Xantina/Xantina oxidasa), se puso de manifiesto que tanto en semen fresco como en semen congelado/descongelado el porcentaje de espermatozoides que producen ROS es inferior al 4 % (Guthrie y Welch, 2006; Guthrie y Welch, 2012). Además, el tratamiento con el sistema generador de ROS no afectó al potencial de membrana mitocondrial. Por lo tanto, los espermatozoides de cerdo podrían ser únicos en relación a los bajos niveles de formación de ROS. En un experimento similar al anterior, realizado para evaluar la peroxidación lipídica en muestras seminales porcinas teñidas con BODIPY en ausencia o presencia de moléculas que inducen la peroxidación lipídica (FeSO<sub>4</sub>/ascorbato sódico), menos del 4% de los espermatozoides frescos o congelados/descongelados presentaron fluorescencia con BODIPY. Es por ello que estos autores concluyen que el semen de cerdo es menos susceptible a la peroxidación lipídica durante la conservación a bajas

temperaturas en ausencia de “procedimientos estresantes” (xantina/xantina oxidasa y  $\text{FeSO}_4$ /ascorbato sódico) en comparación con otras especies (Guthrie y Welch, 2006; Guthrie y Welch, 2012).

Por otra parte, la baja susceptibilidad de los espermatozoides de cerdo a la peroxidación lipídica durante la conservación espermática se ha asociado a uno de los componentes del BTS, el EDTA. Este componente está presente en el BTS a una concentración de 3,34 mM y podría tener un efecto protector durante la conservación debido a que podría inhibir la peroxidación lipídica catalizada por  $\text{Fe}^{2+}$ , como ha sido demostrado en espermatozoides de carnero a concentraciones de 0,3  $\mu\text{M}$  (Jones y Mann, 1976) y de 0,28  $\mu\text{M}$  en espermatozoides de cerdo (Comaschi y cols., 1989).

Actualmente suscita gran interés el desarrollo de nuevos métodos que permitan determinar, de forma más veraz, la fertilidad de dosis seminales de cerdo conservadas mediante refrigeración a 17°C. Este fue en parte uno de los motivos por los que nos pusimos en contacto con el laboratorio de la Doctora Waberski, ya que una de sus líneas de investigación es la optimización de un protocolo para evaluar la capacidad de respuesta de la membrana plasmática de los espermatozoides conservados mediante refrigeración a estímulos capacitantes. Este protocolo se usa para evaluar el potencial fecundante de dosis seminales porcinas y con él tratamos de evaluar el comportamiento de los espermatozoides en un medio *in vitro*, simulando las condiciones fisiológicas *in vivo* que encontraría el espermatozoide en el tracto reproductivo de la hembra (Henning y cols., 2012; Petrunkina y cols., 2005a). Este protocolo se sustenta en los resultados de varios estudios que han demostrado que existe una subpoblación espermática que pierde su capacidad de respuesta a estímulos capacitantes (bicarbonato) durante su conservación a bajas temperaturas (Green y Watson, 2001; Guthrie y Welch, 2005; Harrison, 1996; Petrunkina y cols., 2005b).

El protocolo propuesto por el equipo de la Doctora Waberski se basa fundamentalmente en el estudio de las poblaciones espermáticas que modifican su

contenido en calcio intracelular (teñidos con Fluo3-AM) tras la incubación durante 1 hora en distintos medios: Capacitante ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  15 mM y  $\text{Ca}^{2+}$  2mM), Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$  2mM) y Control (sin  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , ni  $\text{Ca}^{2+}$  2mM). La capacidad de respuesta de los espermatozoides al bicarbonato es calculada como el resultado de la diferencia entre la población espermática (porcentaje) que no se modifica ( $\text{Fluo3-AM}^-/\text{IP}^-$ ) tras una hora de incubación en el medio Capacitante ( $\text{Tyr}_{\text{BicCa}}$ ), y la población de espermatozoides que no se modifica tras una hora de incubación en el medio Calcio ( $\text{Tyr}_{\text{Ca}}$ ). Así, al restar la respuesta en un medio que contiene bicarbonato y calcio ( $\text{Tyr}_{\text{BicCa}}$ ) a la respuesta de un medio que contiene solo calcio ( $\text{Tyr}_{\text{Ca}}$ ) obtendremos el resultado de la acción específica del bicarbonato:  $\text{RESPUESTA AL BICARBONATO} = \text{Tyr}_{\text{BicCa}} (\Delta 60-3) - \text{Tyr}_{\text{Ca}} (\Delta 60-3)$ . Además, podemos calcular la respuesta específica de los espermatozoides incubados en un medio con calcio, como el resultado de la diferencia entre la población espermática que no se modifica ( $\text{Fluo3-AM}^-/\text{IP}^-$ ) tras una hora de incubación en el medio Calcio ( $\text{Tyr}_{\text{Ca}}$ ), y la población de espermatozoides que no se modifica tras una hora de incubación en un medio Control ( $\text{Tyr}_{\text{Control}}$ ). El resultado de esta diferencia es la  $\text{RESPUESTA AL CALCIO} = \text{Tyr}_{\text{Ca}} (\Delta 60-3) - \text{Tyr}_{\text{Control}} (\Delta 60-3)$ .

Pensamos que en un futuro este protocolo puede ser utilizado como técnica de referencia para la determinación de la tolerancia de los espermatozoides a la conservación mediante refrigeración, puesto que la determinación de la motilidad espermática y la integridad de las membranas en un medio de conservación *in vitro* no nos aporta información precisa de cómo se comportarán estos espermatozoides *in vivo*, en el oviducto de la hembra, una vez se haya realizada la inseminación artificial.

Como cabría esperar, nuestros resultados muestran que la conservación de dosis seminales porcinas sin resveratrol (BTS), disminuye la capacidad de respuesta de los espermatozoides al bicarbonato con el transcurso de los días de conservación, resultados acordes a los ya descritos por Henning y cols., (2012). Sin embargo, la adición de resveratrol a dosis seminales porcinas, no solo es incapaz de

prevenir la pérdida de respuesta al bicarbonato con el transcurso del tiempo (resveratrol 33  $\mu\text{M}$ ), sino que a dosis altas (resveratrol 100  $\mu\text{M}$ ) y en periodos largos de conservación, la capacidad de respuesta al bicarbonato disminuye 3 veces con respecto a la capacidad de respuesta de las muestras control. Además, la adición de resveratrol 100  $\mu\text{M}$  el día 7 de conservación, provoca un aumento de la respuesta espermática a la presencia de calcio extracelular 7 veces mayor a la encontrada en las muestras control. Este aumento está asociado a la inestabilidad de las membranas y a una pérdida de la capacidad de los espermatozoides de mantener la homeostasis del calcio (Henning y cols., 2012).

En resumen, teniendo en cuenta todos los datos obtenidos tras el estudio de los parámetros clásicos de calidad espermática y el estudio de la capacidad de respuesta de los espermatozoides al bicarbonato y calcio, nuestros resultados desaconsejan el uso de la melatonina y del resveratrol como aditivos en dosis seminales porcinas, ya que no se ha observado una mejora apreciable durante la conservación a 17°C a largo plazo.

La mayoría de los estudios relacionados con el diseño de nuevos diluyentes para la conservación de dosis seminales mediante refrigeración adolecen de estar basados en modelos empíricos. Otra aproximación sería el estudio de la fisiología celular y regulación de la función de los espermatozoides de cerdo con el objetivo de entender mejor las vías de señalización intracelular y la regulación del metabolismo en estas células germinales. Una mejor comprensión de las vías intracelulares que regulan la función y el metabolismo de los espermatozoides permitiría abordar el diseño de nuevos y más eficaces diluyentes que minimicen la pérdida de la capacidad fecundante de los espermatozoides que se produce durante su conservación a bajas temperaturas (15-17 °C), y por lo tanto poder mejorar los índices reproductivos derivados del uso de la inseminación artificial.

En este sentido, es importante destacar que nuestro grupo de investigación ha descrito recientemente en espermatozoides de cerdo la presencia de la proteína quinasa activada por AMP: la AMPK (Hurtado de Llera y cols., 2012). Esta quinasa

está implicada en la regulación de las rutas metabólicas en células somáticas (Corton et al., 1994) en respuesta a diferentes estímulos, entre ellos, estrés metabólico y energético donde la síntesis de ATP está comprometida (hipoxia, isquemia o baja disponibilidad de nutrientes), o cuando el consumo de ATP está aumentado (Long y Zierath, 2006). Nuestro grupo ha demostrado que en espermatozoides la AMPK regula diversos aspectos de su función, como la motilidad (Hurtado de Llera y cols., 2012), así como la integridad de las membranas plasmática y acrosomal, a la vez que contribuye al mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial (Hurtado de Llera y cols., 2013).

Fruto de nuestro trabajo de investigación sobre la implicación de la proteína AMPK en la conservación de dosis seminales porcinas ha sido la descripción de la localización de la proteína AMPK en espermatozoides de cerdo conservados a 17°C. La AMPK se encuentra principalmente localizada en el acrosoma y en la pieza intermedia del flagelo, dos zonas de vital importancia en el espermatozoide: la primera es la zona de interacción con el ovocito y la segunda es donde se encuentran las mitocondrias, maquinaria mayoritariamente responsable del estado energético de esta célula germinal.

Adicionalmente, hemos descrito por primera vez un aumento de la activación de la AMPK, medida como la fosforilación en el residuo de treonina 172 (PThr172-AMPK) de su subunidad catalítica  $\alpha$ , en función del tiempo de conservación de los espermatozoides porcinos a 17°C, alcanzando un máximo de actividad el día 7 de conservación. Este incremento en la actividad de la AMPK, teniendo en cuenta los resultados en células somáticas, podría estar relacionado con la respuesta metabólica del espermatozoide que tendería a prevenir situaciones de estrés por enfriamiento; de hecho, nuestros resultados muestran una correlación negativa entre el grado de fosforilación de la proteína AMPK y el potencial de membrana mitocondrial en los espermatozoides ( $r = -0,542$ ;  $p < 0,003$ ).

Teniendo en cuenta estos resultados, nos propusimos estudiar el posible papel que juega la AMPK durante la conservación por refrigeración de

espermatozoides porcinos, para lo cual hemos usado un inhibidor de esta proteína: el compuesto C. El resultado de la inhibición de la AMPK es una disminución de la calidad de las dosis seminales, en términos de una disminución de la estabilidad de la membrana y de una reducción de la motilidad espermática.

Nuestros resultados muestran que la actividad de la AMPK es necesaria para mantener la población espermática con alto potencial de membrana mitocondrial durante la conservación. Además, la AMPK fosforilada en la Thr172 interviene en la estabilidad de las membranas del espermatozoide. Esta estabilidad está determinada por un lado, por el mantenimiento de la organización lipídica de la membrana plasmática y por otro, por una correcta integridad de la membrana acrosómica. Resultados similares, apuntando al papel de la AMPK en el mantenimiento de la estabilidad de ambas membranas en el espermatozoide de cerdo, se han demostrado en condiciones fisiológicas a 38,5°C (Hurtado de Llera y cols., 2013), lo que apunta a una relevante implicación fisiológica de la AMPK en el correcto mantenimiento de la organización de las membranas.

Además, de nuestros resultados también se desprende que la proteína AMPK participa en la movilidad espermática durante la refrigeración. Así, influye en parámetros como la velocidad, linealidad o el porcentaje de espermatozoides móviles, datos que están en consonancia a los descritos por Hurtado de Llera y cols. (2012) en espermatozoides de cerdo pero incubados durante cortos periodos a temperatura fisiológica.

Hay por lo tanto datos claros de un papel de la proteína AMPK en el mantenimiento de la calidad seminal durante la conservación a 17°C. Además, esta Tesis muestra que la proteína AMPK podría ser una molécula diana para la mejora de la calidad de dosis seminales porcinas conservadas mediante refrigeración, debido a varios resultados:

1) Su específica localización en compartimentos celulares relacionados directamente con la regulación de la movilidad y el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática y acrosómica.

2) El aumento de la actividad enzimática de la AMPK a lo largo del tiempo de conservación de dosis seminales a 17°C.

3) La inhibición de la AMPK produce una disminución en la calidad de las dosis seminales, evaluada a través de la motilidad y de la estabilidad de las membranas plasmática y acrosomal.

Por todo lo anteriormente mencionado, un objetivo a corto plazo es el estudio de la activación de la AMPK usando un activador específico, Thienopiridona (A769662), y poder así evaluar los parámetros estándar de calidad seminal. Otro objetivo interesante sería el estudio de la capacidad de respuesta de los espermatozoides a condiciones capacitantes, utilizando para ello el novedoso protocolo de respuesta al bicarbonato utilizado en esta Tesis Doctoral.

Antes de pasar a las conclusiones sería importante comentar que los trabajos de la presente Tesis Doctoral nos han ayudado a un mejor entendimiento del proceso de la conservación y de la fisiología del espermatozoide de cerdo. Así, hemos observado que i) existen diferencias intra y entre razas en la tolerancia de los espermatozoides a la conservación en los diferentes diluyentes, y que por tanto debe ser tenido en cuenta en el estudio de nuevos diluyentes; ii) que sustancias con propiedades protectoras en espermatozoides de otras especies no tienen por qué tener el mismo comportamiento en esta célula germinal de cerdo; iii) también hemos avanzado en el campo de la señalización intracelular durante la conservación del semen con la localización y función de la proteína AMPK en espermatozoides. Esta proteína tiene una gran importancia en el control metabólico de células eucariotas y pensamos que se ha abierto un novedoso campo de investigación en espermatología, ya no sólo en la especie porcina, especie de referencia del presente trabajo, sino en las células germinales masculinas de otras especies.





# **Conclusiones/ Conclusions**



- 1) La tolerancia a la conservación a 17°C a largo plazo de dosis seminales de cerdo, medida en términos de modificación de los parámetros de motilidad objetiva, está influida por la raza y por el diluyente.**
- 2) Los resultados de esta Tesis desaconsejan la adición de melatonina o de resveratrol a los diluyentes utilizados en la obtención de dosis seminales de cerdo para su conservación mediante refrigeración a 17°C.**
- 3) Los espermatozoides de cerdo expresan la proteína quinasa activada por AMP, AMPK, en el acrosoma y en la pieza intermedia del flagelo durante la conservación mediante refrigeración a 17°C.**
- 4) La proteína AMPK tiene un efecto positivo en el mantenimiento de la función de los espermatozoides de cerdo en dosis seminales conservadas mediante refrigeración a 17 °C.**



- 1) The tolerance to long term preservation at 17°C of boar seminal doses, evaluated by modifications in objective motility parameters, is influenced by the male breed and the diluent.**
  
- 2) Results from this Thesis do not advise the addition of melatonin or resveratrol to diluent's used for preservation of boar seminal doses by refrigeration at 17 °C.**
  
- 3) Boar spermatozoa express the AMP-activated protein kinase AMPK, which localizes at the acrosome and the middle piece of flagellum during semen preservation at 17 °C.**
  
- 4) AMPK protein has a positive role in the maintenance of boar spermatozoa function from seminal doses preserved by refrigeration at 17 °C.**



# **Bibliografía**





1. Abdel-Wahab MH, 2003: Testicular toxicity of dibromoacetonitrile and possible protection by tertiary butylhydroquinone. *Pharmacol.Res* 47 509-515.
2. Abdul-Aziz M, Meriano J, Casper RF, 1996: Intracytoplasmic sperm injection for treatment of infertility due to acrosomal enzyme deficiency. *Fertil.Steril.* 65 977-980.
3. Acuna-Castroviejo D, Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ, 2001: Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* 30 65-74.
4. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM, 2004: Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod.Biomed.Online.* 8 616-627.
5. Ahn J, Lee H, Kim S, Park J, Ha T, 2008: The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 373 545-549.
6. Aitken RJ, Buckingham D, Harkiss D, 1993: Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J Reprod.Fertil.* 97 441-450.
7. Aitken RJ, Clarkson JS, 1988: Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl* 9 367-376.
8. Althouse GC, Kuster CE, Clark SG, Weisiger RM, 2000: Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology* 53 1167-1176.
9. Alvarez JG, Storey BT, 1982: Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. *Biol.Reprod.* 27 1102-1108.
10. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT, 1987: Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 8 338-348.
11. Anderson J, 1945: *The Semen of Animals and its Use for Artificial Insemination.* Tech.Comm.Imperial Bureau of Animal Breeding Genetic.Edinburgh.
12. Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJ, Sikka SC, 1999: Characterization of reactive oxygen species induced effects on

- human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radic.Biol.Med.* 26 869-880.
13. Askari HA, Check JH, Peymer N, Bollendorf A, 1994: Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. *Arch.Androl* 33 11-15.
  14. Awda BJ, Mackenzie-Bell M, Buhr MM, 2009: Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biol.Reprod.* 81 553-561.
  15. Aziz MH, Kumar R, Ahmad N, 2003a: Cancer chemoprevention by resveratrol: in vitro and in vivo studies and the underlying mechanisms (review). *Int.J Oncol.* 23 17-28.
  16. Aziz MH, Kumar R, Ahmad N, 2003b: Cancer chemoprevention by resveratrol: in vitro and in vivo studies and the underlying mechanisms (review). *Int.J Oncol.* 23 17-28.
  17. Bains R, Miles DM, Carson RJ, Adeghe J, 2001: Hyaluronic acid increases motility/intracellular CA<sup>2+</sup> concentration in human sperm in vitro. *Arch.Androl* 47 119-125.
  18. Baker MA, Hetherington L, Ecroyd H, Roman SD, Aitken RJ, 2004: Analysis of the mechanism by which calcium negatively regulates the tyrosine phosphorylation cascade associated with sperm capacitation. *J Cell Sci.* 117 211-222.
  19. Balik A, Kretschmannova K, Mazna P, Svobodova I, Zemkova H, 2004: Melatonin action in neonatal gonadotrophs. *Physiol Res* 53 *Suppl 1* S153-S166.
  20. Ball BA, Medina V, Gravance CG, Baumbe J, 2001: Effect of antioxidants on preservation of motility,viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 degrees C. *Theriogenology* 56 577-589.
  21. Beconi MT, Francia CR, Mora NG, Affranchino MA, 1993: Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology* 40 841-851.
  22. Ben-Chetrit A, Ben-Chetrit E, Nitzan R, Ron M, 1993: Colchicine inhibits spermatozoal motility in vitro. *Int.J Fertil.Menopausal Stud.* 38 301-304.
  23. Benitez-King G, 2006: Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res* 40 1-9.
  24. Benitez-King G, Anton-Tay F, 1993: Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* 49 635-641.

25. Bensoussan K, Morales CR, Hermo L, 1998: Vitamin E deficiency causes incomplete spermatogenesis and affects the structural differentiation of epithelial cells of the epididymis in the rat. *J Androl* 19 266-288.
26. Bhat KPL, Kosmeder JW, Pezzuto JM, 2001a: Biological effects of resveratrol. *Antioxid.Redox.Signal.* 3 1041-1064.
27. Bhat KPL, Kosmeder JW, Pezzuto JM, 2001b: Biological effects of resveratrol. *Antioxid.Redox.Signal.* 3 1041-1064.
28. Biasutto L, Mattarei A, Marotta E, Bradaschia A, Sassi N, Garbisa S, Zoratti M, Paradisi C, 2008: Development of mitochondria-targeted derivatives of resveratrol. *Bioorg.Med Chem Lett.* 18 5594-5597.
29. Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT, 2002: Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr.Top.Med.Chem.* 2 113-132.
30. Bornman MS, Oosthuizen JM, Barnard HC, Schulenburg GW, Boomker D, Reif S, 1989: Melatonin and sperm motility. *Andrologia* 21 483-485.
31. Branco CS, Garcez ME, Pasqualotto FF, Erdtman B, Salvador M, 2010: Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology* 60 235-237.
32. Breininger E, Beorlegui NB, O'Flaherty CM, Beconi MT, 2005: Alphatocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology* 63 2126-2135.
33. Breitbart H, Rubinstein S, 1983: Calcium transport by bull spermatozoa plasma membranes. *Biochim.Biophys.Acta* 732 464-468.
34. Breitbart H, Rubinstein S, Nass-Arden L, 1985: The role of calcium and Ca<sup>2+</sup>-ATPase in maintaining motility in ram spermatozoa. *J Biol.Chem* 260 11548-11553.
35. Brezezinska-Slebodzinska E, Slebodzinski AB, Pietras B, Wieczorek G, 1995: Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biol.Trace Elem.Res* 47 69-74.
36. Brunmair B, Staniek K, Gras F, Scharf N, Althaym A, Clara R, Roden M, Gnaiger E, Nohl H, Waldhausl W, Fornsinn C, 2004: Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? *Diabetes* 53 1052-1059.

37. Bustos-Obregon E, Gonzalez JR, Espinoza O, 2005: Melatonin as protective agent for the cytotoxic effects of diazinon in the spermatogenesis in the earthworm *Eisenia foetida*. *Ital.J Anat.Embryol.* *110* 159-165.
38. Cárdenas RN, Pedraza CJ, 2006: Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación química* *17* 164-173.
39. Carling D, 2004: The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem.Sci* *29* 18-24.
40. Carling D, Hardie DG, 1989: The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. *Biochim.Biophys.Acta* *1012* 81-86.
41. Casao A, Gallego M, Abecia JA, Forcada F, Perez-Pe R, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA, 2012: Identification and immunolocalisation of melatonin MT(1) and MT(2) receptors in Rasa Aragonesa ram spermatozoa. *Reprod Fertil.Dev.* *24* 953-961.
42. Castillo C, Benedicto LJ, López-Alonso M, Miranda M, Hernández J, 2001: Importancia del estrés oxidativo en el ganado vacuno: en relación con el estado fisiológico (preñez y parto) y la nutrición. *Arch Med Vet* *33* 204-218.
43. Cerolini S, Maldjian A, Surai P, Noble R, 2000: Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim Reprod.Sci.* *58* 99-111.
44. Chihuailaf RH, Contreras PA, Wittwer FG, 2002: Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. *Veterinaria México* *33*.
45. Ciereszko A, Ottobre JS, Glogowski J, 2000: Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. *Anim Reprod.Sci.* *64* 89-96.
46. Colenbrander B, Feitsma H, Grooten HJ, 1993: Optimizing semen production for artificial insemination in swine. *J Reprod.Fertil.Suppl* *48* 207-215.
47. Collodel G, Federico MG, Geminiani M, Martini S, Bonechi C, Rossi C, Figura N, Moretti E, 2011: Effect of trans-resveratrol on induced oxidative stress in human sperm and in rat germinal cells. *Reprod.Toxicol.* *31* 239-246.
48. Comaschi V, Lindner L, Farruggia G, Gesmundo N, Colombi L, Masotti L, 1989: An investigation on lipoperoxidation mechanisms in boar spermatozoa. *Biochem.Biophys.Res Commun.* *158* 769-775.

49. Conejo-Nava J, Fierro R, Gutierrez CG, Betancourt M, 2003: Membrane status and in vitro capacitation of porcine sperm preserved in long-term extender at 16 degrees C. *Arch.Androl* 49 287-295.
50. Conlon PD, Kennedy BW, 1978: A comparison of crossbred and purebred boar for semen and reproductive characteristics. *Can.J.Anim.Sci* 58 63-70.
51. Conti M, Beavo J, 2007: Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu.Rev.Biochem.* 76 481-511.
52. Contri A, Gloria A, Robbe D, Valorz C, Wegher L, Carluccio A, 2013: Kinematic study on the effect of pH on bull sperm function. *Anim Reprod Sci* 136 252-259.
53. Cool B, Zinker B, Chiou W, Kifle L, Cao N, Perham M, Dickinson R, Adler A, Gagne G, Iyengar R, Zhao G, Marsh K, Kym P, Jung P, Camp HS, Frevert E, 2006: Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab* 3 403-416.
54. Cordoba IA, Ruiz LC, Cordoba JC, Cordoba JM, Guerra LJ, Rodriguez DB, Arancibia SK, 2009: Oxidative stress and antioxidants in the spermatid conservation. *R.C.C.V* 3 1-18.
55. Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG, 1995: 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur.J Biochem.* 229 558-565.
56. Costa EJ, Shida CS, Biaggi MH, Ito AS, Lamy-Freund MT, 1997: How melatonin interacts with lipid bilayers: a study by fluorescence and ESR spectroscopies. *FEBS Lett.* 416 103-106.
57. Crabo BG, Brown KI, Graham EF, 1972: Effect of some buffers on storage and freezing of boar spermatozoa. *J Anim Sci.* 35 377-382.
58. Crute BE, Seefeld K, Gamble J, Kemp BE, Witters LA, 1998: Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J Biol.Chem.* 273 35347-35354.
59. Cummins JM, Jequier AM, Kan R, 1994: Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress? *Mol.Reprod.Dev.* 37 345-362.
60. da Silva CM, Macias-Garcia B, Miro-Moran A, Gonzalez-Fernandez L, Morillo-Rodriguez A, Ortega-Ferrusola C, Gallardo-Bolanos JM, Stilwell G, Tapia JA,

- 
- Pena FJ, 2011: Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. *J Pineal Res* 51 172-179.
61. Dani C, Bonatto D, Salvador M, Pereira MD, Henriques JA, Eleutherio E, 2008: Antioxidant protection of resveratrol and catechin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem* 56 4268-4272.
62. Davies SP, Helps NR, Cohen PT, Hardie DG, 1995: 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett.* 377 421-425.
63. De Ambrogi M., Ballester J, Saravia F, Caballero I, Johannisson A, Wallgren M, Andersson M, Rodriguez-Martinez H, 2006: Effect of storage in short--and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. *Int.J Androl* 29 543-552.
64. De Ambrogi M, Ballester J, Saravia F, Caballero I, Johannisson A, Wallgren M, Andersson M, Rodriguez-Martinez H, 2006: Effect of storage in short--and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. *Int.J Androl* 29 543-552.
65. de Lamirande E, Gagnon C, 1992: Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl* 13 379-386.
66. de Lamirande E, Gagnon C, 1993: A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int.J Androl* 16 21-25.
67. De Leeuw FE, Chen HC, Colenbrander B, Verkleij AJ, 1990: Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology* 27 171-183.
68. de Rooij DG, Russell LD, 2000: All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 21 776-798.
69. Degáspari CH, Waszczyński N, 2004: Propiedades antioxidantes de compuestos fenólicos (antioxidant properties of phenolic compounds). *Visao Acad* 5 33-40.
70. Delmas D, Jannin B, Latruffe N, 2005: Resveratrol: preventing properties against vascular alterations and ageing. *Mol.Nutr.Food Res* 49 377-395.

71. Didion BA, Braun GD, Duggan MV, 2013: Field fertility of frozen boar semen: a retrospective report comprising over 2600 AI services spanning a four year period. *Anim Reprod Sci* 137 189-196.
72. Dominguez-Rebolledo AE, Fernandez-Santos MR, Bisbal A, Ros-Santaella JL, Ramon M, Carmona M, Martinez-Pastor F, Garde JJ, 2010: Improving the effect of incubation and oxidative stress on thawed spermatozoa from red deer by using different antioxidant treatments. *Reprod Fertil.Dev.* 22 856-870.
73. Donoghue AM, Donoghue DJ, 1997: Effects of water- and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. *Poult.Sci* 76 1440-1445.
74. Doolen S, Krause DN, Dubocovich ML, Duckles SP, 1998: Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. *Eur.J Pharmacol.* 345 67-69.
75. Dubocovich ML, Markowska M, 2005: Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine.* 27 101-110.
76. Dubocovich ML, Masana MI, Iacob S, Sauri DM, 1997: Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 355 365-375.
77. Dyck MK, Buhr MM, 1994: Phospholipase A2 activity in fresh and cryopreserved spermatozoa from boars. *Can.J.Anim.Sci* 74 59-64.
78. Ekmekcioglu C, 2006: Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomed.Pharmacother.* 60 97-108.
79. El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Averet N, Rigoulet M, Leverve X, 2000: Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol.Chem* 275 223-228.
80. Eriksson BM, Petersson H, Rodriguez-Martinez H, 2002: Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. *Theriogenology* 58 1065-1079.
81. Estienne MJ, Harper AF, Day JL, 2007: Characteristics of sperm motility in boar semen diluted in different extenders and stored for seven days at 18 degrees C. *Reprod Biol.* 7 221-231.
82. Faustini M, Torre ML, Stacchezzini S, Norberti R, Consiglio AL, Porcelli F, Conte U, Munari E, Russo V, Vigo D, 2004: Boar spermatozoa encapsulated



- in barium alginate membranes: a microdensitometric evaluation of some enzymatic activities during storage at 18 degrees C. *Theriogenology* 61 173-184.
83. Ford WC, 2006: Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Hum.Reprod.Update.* 12 269-274.
  84. Franca LR, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, Russell LD, 1998: Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol.Reprod.* 59 1371-1377.
  85. Frankenhuis MT, Kramer MF, de Rooij DG, 1982: Spermatogenesis in the boar. *Vet.Q.* 4 57-61.
  86. Fraser L, Gorszyczaruk K, Strzezek J, 2001: Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reprod.Domest.Anim* 36 325-329.
  87. Fridovich I, 1997: Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol.Chem* 272 18515-18517.
  88. Fridovich I, 2003: Editorial commentary on "Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide" by H. Zhao et al. *Free Radic.Biol.Med* 34 1357-1358.
  89. Froman DP, Feltmann AJ, 2010: A new approach to sperm preservation based on bioenergetic theory. *J Anim Sci* 88 1314-1320.
  90. Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D, 2002a: Protein kinase inhibitors block the stimulation of the AMP-activated protein kinase by 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside. *FEBS Lett.* 531 189-192.
  91. Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D, 2002b: The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J Biol.Chem.* 277 25226-25232.
  92. Fuhrmann H, Waberski D, Sallman HP, Hellmann K, Weitze KF, 1991: Lipid peroxidation in boar semen: a relevant aspect of semen storage. *Reprod Domest Anim* 26(Suppl 1) 337-341.
  93. Fujinoki M, 2008: Melatonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. *Reproduction.* 136 533-541.
  94. Fujiwara H, Hosokawa M, Zhou X, Fujimoto S, Fukuda K, Toyoda K, Nishi Y, Fujita Y, Yamada K, Yamada Y, Seino Y, Inagaki N, 2008: Curcumin inhibits glucose production in isolated mice hepatocytes. *Diabetes Res Clin.Pract.* 80 185-191.

95. Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G, 2010: Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat.Rev.Drug Discov.* 9 447-464.
96. Funahashi H, Sano T, 2005: Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C. *Theriogenology* 63 1605-1616.
97. Gadalla AE, Pearson T, Currie AJ, Dale N, Hawley SA, Sheehan M, Hirst W, Michel AD, Randall A, Hardie DG, Frenguelli BG, 2004: AICA riboside both activates AMP-activated protein kinase and competes with adenosine for the nucleoside transporter in the CA1 region of the rat hippocampus. *J Neurochem.* 88 1272-1282.
98. Gadea J, 2003: Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Span J Agric Res* 1 17-27.
99. Garcez ME, dos Santos BC, Lara LV, Pasqualotto FF, Salvador M, 2010: Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. *Fertil.Steril.* 94 2118-2121.
100. Garcia JJ, Reiter RJ, Pie J, Ortiz GG, Cabrera J, Sainz RM, Acuna-Castroviejo D, 1999: Role of pinoline and melatonin in stabilizing hepatic microsomal membranes against oxidative stress. *J Bioenerg.Biomembr.* 31 609-616.
101. Gil, L., Solorzano, M., Malo, M., Pinto, D., Gonzalez, N., De Blas, I., and Anso, T. Efecto de la adición de gelificantes a un diluyente comercial porcino. I Congreso nacional de veterinarios de porcino.Zaragoza . 2008.
102. Gilmore JA, Du J, Tao J, Peter AT, Critser JK, 1996: Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *J Reprod.Fertil.* 107 87-95.
103. Gogol P, Pieszka M, 2008: Ferrous ion induced photon emission as a method to quantify oxidative stress in stored boar spermatozoa. *Folia Biol.(Krakow.)* 56 173-177.
104. Goransson O, McBride A, Hawley SA, Ross FA, Shpiro N, Foretz M, Viollet B, Hardie DG, Sakamoto K, 2007: Mechanism of action of A-769662, a valuable tool for activation of AMP-activated protein kinase. *J Biol.Chem* 282 32549-32560.
105. Gottardi, L., Brunel, L., and Zanelli, L. New dilution media for artificial insemination in the pig. 9th International Congress on Animal Reproduction (ICAR) 5, 49-53. 1980. Madrid.

106. Graeme JG, Hawley SA, Ross FA, Hardie DG, 2013: AMP is a True Physiological Regulator of AMP-Activated Protein Kinase by Both Allosteric Activation and Enhancing Net Phosphorylation. *Cell Metab* 18 556-566.
107. Gravance CG, Garner DL, Baumber J, Ball BA, 2000: Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology* 53 1691-1703.
108. Green CE, Watson PF, 2001: Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*. 122 889-898.
109. Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Le LD, 1995: Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J Reprod.Fertil.* 103 17-26.
110. Guerra MM, Evans G, Maxwell WM, 2004: Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia (role of antioxidants and antioxidants in andrology). *Rev Bras Reprod Anim* 28 187-195.
111. Guerrero JM, Reiter RJ, 2002: Melatonin-immune system relationships. *Curr.Top.Med.Chem.* 2 167-179.
112. Gulay L, Aysekendircy GI, 1996: Melatonin exerts stimulatory effect on human sperm motility, in vitro. *Journal of Islamic Academy of Sciences* 9 13-18.
113. Guthrie HD, Welch GR, 2005: Effects of hypothermic liquid storage and cryopreservation on basal and induced plasma membrane phospholipid disorder and acrosome exocytosis in boar spermatozoa. *Reprod.Fertil.Dev.* 17 467-477.
114. Guthrie HD, Welch GR, 2006: Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J Anim Sci* 84 2089-2100.
115. Guthrie HD, Welch GR, 2007: Use of fluorescence-activated flow cytometry to determine membrane lipid peroxidation during hypothermic liquid storage and freeze-thawing of viable boar sperm loaded with 4, 4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid. *J Anim Sci* 85 1402-1411.
116. Guthrie HD, Welch GR, 2008: Determination of high mitochondrial membrane potential in spermatozoa loaded with the mitochondrial probe 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1) by using fluorescence-activated flow cytometry. *Methods Mol.Biol.* 477 89-97.

117. Guthrie HD, Welch GR, 2012: Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology* 78 1700-1708.
118. Gwayi N, Bernard RT, 2002: The effects of melatonin on sperm motility in vitro in Wistar rats. *Andrologia* 34 391-396.
119. Halliwell B, Gutteridge JMC, 1999: Free radicals in biology and medicine. Oxford, UK.
120. Hardeland R, 2005: Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine*. 27 119-130.
121. Hardeland R, Poeggeler B, 2003: Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res* 34 233-241.
122. Hardie DG, 2007: AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 8 774-785.
123. Hardie DG, 2008: Role of AMP-activated protein kinase in the metabolic syndrome and in heart disease. *FEBS Lett.* 582 81-89.
124. Hardie DG, Alessi DR, 2013: LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link - ten years after. *BMC.Biol* 11 36.
125. Hardie DG, Carling D, Gamblin SJ, 2011: AMP-activated protein kinase: also regulated by ADP? *Trends Biochem.Sci* 36 470-477.
126. Hardie DG, Hawley SA, 2001: AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays* 23 1112-1119.
127. Hardie DG, Hawley SA, Scott JW, 2006: AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. *J Physiol* 574 7-15.
128. Hardie DG, Pan DA, 2002: Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochem.Soc.Trans.* 30 1064-1070.
129. Harrison RA, 1996: Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod.Fertil.Dev.* 8 581-594.
130. Harrison RA, Ashworth PJ, Miller NG, 1996: Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol.Reprod.Dev.* 45 378-391.
131. Harrison RA, Dott HM, Foster GC, 1978: Effect of ionic strength, serum albumin and other macromolecules on the maintenance of motility and the surface of mammalian spermatozoa in a simple medium. *J Reprod.Fertil.* 52 65-73.

132. Harrison RA, Dott HM, Foster GC, 1982: Bovine serum albumin, sperm motility, and the "dilution effect". *J Exp.Zool.* 222 81-88.
133. Hatamoto LK, Baptista Sobrinho CA, Nichi M, Barnabe VH, Barnabe RC, Cortada CN, 2006: Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and Vitamin E oral supplementation on the spermiogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. *Theriogenology* 66 1610-1614.
134. Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Makela TP, Alessi DR, Hardie DG, 2003: Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol.* 2 28.
135. Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D, Hardie DG, 1996: Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol.Chem.* 271 27879-27887.
136. Hawley SA, Gadalla AE, Olsen GS, Hardie DG, 2002: The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes* 51 2420-2425.
137. Hawley SA, Ross FA, Chevtzoff C, Green KA, Evans A, Fogarty S, Towler MC, Brown LJ, Ogunbayo OA, Evans AM, Hardie DG, 2010: Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metab* 11 554-565.
138. Hemminki A, 1999: The molecular basis and clinical aspects of Peutz-Jeghers syndrome. *Cell Mol.Life Sci* 55 735-750.
139. Henning H, Petrunkina AM, Harrison RA, Waberski D, 2012: Bivalent response to long-term storage in liquid-preserved boar semen: a flow cytometric analysis. *Cytometry A* 81 576-587.
140. Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB, 1997: A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* 390 509-512.
141. Hicks JJ, Torres RY, Sierra VM, 2006: Estrés oxidativo. Concepto y Clasificación. *Endrocrinología y Nutrición* 4 223-226.
142. Hirai M, Cerbito WA, Wijayagunawardane MP, Braun J, Leidl W, Ohosaki K, Matsuzawa T, Miyazawa K, Sato K, 1997: The effect of viscosity of semen diluents on motility of bull spermatozoa. *Theriogenology* 47 1463-1478.

143. Hofmo PO, Grevle IS, 1999: Development and commercial use of frozen boar semen in Norway. In: Johnson LA and Guthrie HD (eds), Boar Semen Preservation III. Allen Pres, Inc USA, pp. 71-77.
144. Hofmo PO, Grevle IS, 2000: Development and commercial use of frozen semen in Norway. Allen Pres, Inc., Lawrence, KS pp. 71-77.
145. Hofmo PO, Kommisrud E, Sehested E, 1998: A field trial comparing the fertility of fresh semen stored in BTS for 2-3 days and MR-A for 4-5 days. Proceedings of the 15 th International Pig Veterinary Society Congress 3.
146. Holt WV, 2000: Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53 47-58.
147. Holt WV, Fazeli A, 2010: The oviduct as a complex mediator of mammalian sperm function and selection. *Mol.Reprod.Dev.* 77 934-943.
148. Hu JH, Tian WQ, Zhao XL, Zan LS, Wang H, Li QW, Xin YP, 2010: The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. *Anim Reprod.Sci.* 121 72-77.
149. Hudson ER, Pan DA, James J, Lucocq JM, Hawley SA, Green KA, Baba O, Terashima T, Hardie DG, 2003: A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Curr.Biol.* 13 861-866.
150. Huebner O, 1898: Tumor des Glandula pinealis. *Dtsch Med Wochenschr* 24 214-215.
151. Huerto-Delgadillo L, Anton-Tay F, Benitez-King G, 1994: Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J Pineal Res* 17 55-62.
152. Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, Inzucchi SE, Schumann WC, Petersen KF, Landau BR, Shulman GI, 2000: Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes* 49 2063-2069.
153. Huo LJ, Ma XH, Yang ZM, 2002: Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology* 58 1349-1360.
154. Hurtado de Llera A, Martin-Hidalgo D, Gil MC, Garcia-Marin LJ, Bragado MJ, 2012: AMP-activated kinase AMPK is expressed in boar spermatozoa and regulates motility. *PLoS.One.* 7 e38840.
155. Hurtado de Llera A, Martin-Hidalgo D, Rodriguez-Gil JE, Gil MC, Garcia-Marin LJ, Bragado MJ, 2013: AMP-activated kinase, AMPK, is involved in the

- maintenance of plasma membrane organization in boar spermatozoa. *Biochim.Biophys.Acta* 1828 2143-2151.
156. Hwang JT, Lee MS, Kim HJ, Sung MJ, Kim HY, Kim MS, Kwon DY, 2009: Antiobesity effect of ginsenoside Rg3 involves the AMPK and PPAR-gamma signal pathways. *Phytother.Res* 23 262-266.
  157. Irez TO, Senol H, Alagoz M, Basmaciogullari C, Turan F, Kuru D, Ertungealp E, 1992: Effects of indoleamines on sperm motility in vitro. *Hum.Reprod* 7 987-990.
  158. Ito T, Niwa T, Kudo A, 1948: Studies of Artificial insemination on swine. *Zootech.Exp.Sta.Res.Bull* 55 1-74.
  159. Ivanow E, 1907: De la fécondation artificielle chez les mammifères. *Arch Sci Biol* 12 377-511.
  160. Ivanow E, 1922: On the use of artificial insemination for zootechnical purpose in Russia. *J Agric Sci* 12 244-256.
  161. Jang HY, Kim S, Kim JT, Park CK, Cheong HT, Lee HJ, Lee HJ, Yang BK, 2006: Effects of Antioxidants on Sperm Motility During in Vitro Storage of Boar Semen. *Kor J Gerontol* 6 47-51.
  162. Jang HY, Kim YH, Kim BW, Park IC, Cheong HT, Kim JT, Park CK, Kong HS, Lee HK, Yang BK, 2010: Ameliorative effects of melatonin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. *Reprod.Domest.Anim* 45 943-950.
  163. Jeong YJ, Kim MK, Song HJ, Kang EJ, Ock SA, Kumar BM, Balasubramanian S, Rho GJ, 2009: Effect of alpha-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology* 58 181-189.
  164. Jeulin C, Soufir JC, Weber P, Laval-Martin D, Calvayrac R, 1989: Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res* 24 185-196.
  165. Johnson LA, Aalbers JG, Grooten HJ, 1988: Artificial insemination of swine: Fecundity of boar semen stored in Bestville TS BTS., Modified Modena (MM), MR-A and inseminated on one, three or four days after collection. *Zuchthygiene* 23 49-55.
  166. Johnson LA, Aalbers JG, Willems CM, Sybesma W, 1981: Use of spermatozoa for artificial insemination. I. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms. *J Anim Sci* 52 1130-1136.
  167. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM, 2000: Storage of boar semen. *Anim Reprod.Sci.* 62 143-172.

168. Johnston JD, Messenger S, Ebling FJ, Williams LM, Barrett P, Hazlerigg DG, 2003: Gonadotrophin-releasing hormone drives melatonin receptor down-regulation in the developing pituitary gland. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 2831-2835.
169. Jones R, Mann T, 1976: Lipid peroxides in spermatozoa; formation, role of plasmalogen, and physiological significance. *Proc.R.Soc Lond B Biol.Sci* 193 317-333.
170. Jones R, Mann T, 1977: Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *J Reprod.Fertil.* 50 261-268.
171. Jones R, Mann T, Sherins R, 1979: Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil.Steril.* 31 531-537.
172. Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ, Thompson CB, 2005: AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol.Cell* 18 283-293.
173. Juan ME, Gonzalez-Pons E, Munuera T, Ballester J, Rodriguez-Gil JE, Planas JM, 2005: trans-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. *J.Nutr.* 135 757-760.
174. Kadirvel G, Kumar S, Kumaresan A, 2009: Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. *Anim Reprod.Sci.* 114 125-134.
175. Kaeoket K, Sang-urai P, Thamniyom A, Chanapiwat P, Techakumphu M, 2010: Effect of docosahexaenoic acid on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. *Reprod Domest Anim* 45 458-463.
176. Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, Hammami M, Gharbi N, Kamoun A, El-Fazaa S, 2006: Protective effect of resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Alcohol Alcohol* 41 236-239.
177. Kennedy BW, Wilkins JN, 1984: Boar, breed and enviromental factors influencing semen characteristics of boars used in artificial insemination. *Can.J.Anim.Sci* 64 833-843.
178. Kennedy JH, Korn N, Thurston RJ, 2003: Prostaglandin levels in seminal plasma and sperm extracts of the domestic turkey, and the effects of cyclooxygenase inhibitors on sperm mobility. *Reprod Biol.Endocrinol.* 1 74.
179. Kessopoulou E, Powers HJ, Sharma KK, Pearson MJ, Russell JM, Cooke ID, Barratt CL, 1995: A double-blind randomized placebo cross-over controlled



- trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. *Fertil.Steril.* 64 825-831.
180. Kilanczyk E, Bryszewska M, 2003: The effect of melatonin on antioxidant enzymes in human diabetic skin fibroblasts. *Cell Mol.Biol.Lett.* 8 333-336.
  181. King TD, Song L, Jope RS, 2006: AMP-activated protein kinase (AMPK) activating agents cause dephosphorylation of Akt and glycogen synthase kinase-3. *Biochem.Pharmacol.* 71 1637-1647.
  182. Kitay JI, 1954: *The Pineal Gland.* Cambridge: Harvard Universiti Press.
  183. Kobayashi Y, Itoh MT, Kondo H, Okuma Y, Sato S, Kanishi Y, Hamada N, Kiguchi K, Ishizuka B, 2003: Melatonin binding sites in estrogen receptor-positive cells derived from human endometrial cancer. *J Pineal Res* 35 71-74.
  184. Kommisrud E, Paulenz H, Sehested E, Grevle IS, 2002: Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta Vet.Scand.* 43 49-55.
  185. Kumaresan A, Kadirvel G, Bujarbaruah KM, Bardoloi RK, Das A, Kumar S, Naskar S, 2009: Preservation of boar semen at 18 degrees C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. *Anim Reprod.Sci.* 110 162-171.
  186. Kuster CE, Althouse GC, 1999: The fecundity of porcine semen stored for 2 to 6 days in Androhep and X-CELL extenders. *Theriogenology* 52 365-376.
  187. Kyselova V, Peknicova J, Buckiova D, Boubelik M, 2003: Effects of p-nonylphenol and resveratrol on body and organ weight and in vivo fertility of outbred CD-1 mice. *Reprod Biol.Endocrinol.* 1 30.
  188. LeBrasseur NK, Kelly M, Tsao TS, Farmer SR, Saha AK, Ruderman NB, Tomas E, 2006: Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. *Am J Physiol Endocrinol.Metab* 291 E175-E181.
  189. Leon J, Acuna-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, Reiter RJ, 2004: Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci* 75 765-790.
  190. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee Y, Mori M, 1958: Isolation of melatoni, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 80 2587.
  191. Lewis DG, 2013: *Liquid boar semen production: current extender technology for long-term storage and where we go from here!* Allen Pres Inc. Lawrence, KS, United States pp. 121-128.

192. Li L, Xu JN, Wong YH, Wong JT, Pang SF, Shiu SY, 1998: Molecular and cellular analyses of melatonin receptor-mediated cAMP signaling in rat corpus epididymis. *J Pineal Res* 25 219-228.
193. Lin X, Wu G, Huo WQ, Zhang Y, Jin FS, 2012: Resveratrol induces apoptosis associated with mitochondrial dysfunction in bladder carcinoma cells. *Int.J.Urol.* 19 757-764.
194. Liu G, Grifman M, Macdonald J, Moller P, Wong-Staal F, Li QX, 2007: Isoginkgetin enhances adiponectin secretion from differentiated adiposarcoma cells via a novel pathway involving AMP-activated protein kinase. *J Endocrinol.* 194 569-578.
195. Liu Z, Zhang LP, Ma HJ, Wang C, Li M, Wang QS, 2005: Resveratrol reduces intracellular free calcium concentration in rat ventricular myocytes. *Sheng Li Xue.Bao.* 57 599-604.
196. Long YC, Zierath JR, 2006: AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin.Invest* 116 1776-1783.
197. Low IC, Chen ZX, Pervaiz S, 2010: Bcl-2 modulates resveratrol-induced ROS production by regulating mitochondrial respiration in tumor cells. *Antioxid.Redox.Signal.* 13 807-819.
198. Luboshitzky R, Shen-Orr Z, Herer P, 2002: Seminal plasma melatonin and gonadal steroids concentrations in normal men. *Arch Androl* 48 225-232.
199. Manchester LC, Tan DX, Reiter RJ, Park W, Monis K, Qi W, 2000: High levels of melatonin in the seeds of edible plants: possible function in germ tissue protection. *Life Sci.* 67 3023-3029.
200. Martin Rillo S, 1984: How AI is progresing in Spain. *Pig Intern* 5 24-28.
201. Martin Rillo S, Shokouhi V, García E, Hernández R, Romero L, 1998: Contamination of semen doses and its possible relationship with the bacterial flora of the prepuce. In 15th International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress 3 60.
202. Martin M, Macias M, Escames G, Reiter RJ, Agapito MT, Ortiz GG, Acuna-Castroviejo D, 2000: Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *J Pineal Res* 28 242-248.
203. Martinez EA, Ruiz S, Sebastian J, Sanchez R, Garcia C, Martin SR, 1986: Factores que afectan a la inseminación artificial porcina (Factors affecting porcine AI). *Anales Veterinarios de Murcia* 2 115-120.

204. Mas M, Arando A, Suarez I, 1980: Effects of melatonin treatments on male rat reproductive system. *EPSPG Newslett* 7 25.
205. Mas M, Oaking S, 1977: Effects of pineal 5-methoxyindoles on male sex behavior and spermatogenesis. *Pineal Gland Symposium* 18.
206. Maule, J. P. *The Semen of Animal and Artificial Insemination Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, U.K.* 1962.
207. Maxwell WM, Stojanov T, 1996: Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod.Fertil.Dev.* 8 1013-1020.
208. McBride A, Ghilagaber S, Nikolaev A, Hardie DG, 2009: The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor. *Cell Metab* 9 23-34.
209. McKenzie FF, 1931: A method for collection of boar semen. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 78 244-246.
210. Meister A, Tate SS, 1976: Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Annu.Rev.Biochem.* 45 559-604.
211. Membrillo OA, Cordoba IA, Hicks GJJ, Olivares CIM, Martínez TVM, Valencia MJJ, 2003: Peroxidación Lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. *Interciencia* 28 699-704.
212. Mendonca LL, Khamashta MA, Nelson-Piercy C, Hunt BJ, Hughes GR, 2000: Non-steroidal anti-inflammatory drugs as a possible cause for reversible infertility. *Rheumatology.(Oxford)* 39 880-882.
213. Meyers SA, 2001: Equine sperm-oocyte interaction: the role of sperm surface hyaluronidase. *Anim Reprod.Sci.* 68 291-303.
214. Miki K, 2007: Energy metabolism and sperm function. *Soc.Reprod.Fertil.Suppl* 65 309-325.
215. Milanow, V. K. *Isskusstvenoye Ossemenebe Selsko-Khozasvennykh Jivotnykh (The Artificial Insemination of FArm Animals).* Seljhozgiz, Mowcow. 1938.
216. Mills SE, Foster DW, McGarry JD, 1983: Interaction of malonyl-CoA and related compounds with mitochondria from different rat tissues. Relationship between ligand binding and inhibition of carnitine palmitoyltransferase I. *Biochem.J* 214 83-91.
217. Mukherjee S, Dudley JI, Das DK, 2010: Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Dose.Response* 8 478-500.

218. Nair SJ, Brar AS, Ahuja CS, Sangha SP, Chaudhary KC, 2006: A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. *Anim Reprod.Sci.* 96 21-29.
219. Nebel RL, Bame JH, Saacke RG, Lim F, 1985: Microencapsulation of bovine spermatozoa. *J Anim Sci.* 60 1631-1639.
220. Nishikawa, Y. History and development of Artificial Insemination in the world. 5th Int.Congr.Anim.Reprod.Artif.Insem.Trento, Italy. 7, 153-279. 1964.
221. Niwa T, 1958: Artificial insemination with swine in Japan. *Natl.Inst.Agric.Sci, Chiba-shi, Japan.*
222. Oehninger S, Blackmore P, Mahony M, Hodgen G, 1995: Effects of hydrogen peroxide on human spermatozoa. *J Assist.Reprod.Genet.* 12 41-47.
223. Okazaki T, Ikoma E, Tinen T, Akiyoshi T, Mori M, Teshima H, 2013: Addition of oxytocin to semen extender improves both sperm transport to the oviduct and conception rates in pigs following AI. *Anim Sci J.*
224. Olguín CG, Guiller GM, Zúñiga RRA, Pasqueti PA, 2004: Antioxidantes y aterosclerosis. *Endocrinología y Nutrición* 12 199-206.
225. Ortman K, Rodriguez-Martinez H, 1994: Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags. *Zentralbl.Veterinarmed.A* 41 37-47.
226. Ourique GM, Finamor IA, Saccol EM, Riffel AP, Pes TS, Gutierrez K, Goncalves PB, Baldisserotto B, Pavanato MA, Barreto KP, 2013: Resveratrol improves sperm motility, prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defences in the testes of hyperthyroid rats. *Reprod.Toxicol.* 37 31-39.
227. Owen MR, Doran E, Halestrap AP, 2000: Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem.J* 348 Pt 3 607-614.
228. Pablos MI, Reiter RJ, Ortiz GG, Guerrero JM, Agapito MT, Chuang JI, Sewerynek E, 1998: Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem.Int.* 32 69-75.
229. Pang T, Zhang ZS, Gu M, Qiu BY, Yu LF, Cao PR, Shao W, Su MB, Li JY, Nan FJ, Li J, 2008: Small molecule antagonizes autoinhibition and activates AMP-activated protein kinase in cells. *J Biol.Chem* 283 16051-16060.

- 
230. Park SJ, Ahmad F, Philp A, Baar K, Williams T, Luo H, Ke H, Rehmann H, Taussig R, Brown AL, Kim MK, Beaven MA, Burgin AB, Manganiello V, Chung JH, 2012: Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell* 148 421-433.
  231. Pervaiz S, Holme AL, 2009: Resveratrol: its biologic targets and functional activity. *Antioxid.Redox.Signal.* 11 2851-2897.
  232. Petrunkina AM, Volker G, Brandt H, Topfer-Petersen E, Waberski D, 2005a: Functional significance of responsiveness to capacitating conditions in boar spermatozoa. *Theriogenology* 64 1766-1782.
  233. Petrunkina AM, Volker G, Weitze KF, Beyerbach M, Topfer-Petersen E, Waberski D, 2005b: Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. *Theriogenology* 63 2278-2299.
  234. Peyrot F, Ducrocq C, 2008: Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. *J Pineal Res* 45 235-246.
  235. Polge C, 1956: Artificial insemination in pigs. *Vet.Rec.* 68 62-76.
  236. Poon AM, Pang SF, 1992: 2[125I]iodomelatonin binding sites in spleens of guinea pigs. *Life Sci.* 50 1719-1726.
  237. Pursel VG, Schulman LL, Johnson LA, 1978: Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *J.Anim Sci.* 47 198-202.
  238. Rao MV, Gangadharan B, 2008: Antioxidative potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa in vitro. *Toxicol.In Vitro* 22 935-942.
  239. Rath D, Bathgate R, Rodriguez-Martinez H, Roca J, Strzezek J, Waberski D, 2009: Recent advances in boar semen cryopreservation. *Soc.Reprod.Fertil.Suppl* 66 51-66.
  240. Ratto J, Jokinen L, 1990: Reports about number of swine inseminations and farrowing results in Filand 1989, comparison between two diluents EDTA and MR-A. *Reprod Domest Anim* 1 365-368.
  241. Reiter RJ, 1973: Comparative physiology: pineal gland. *Annu.Rev.Physiol* 35 305-328.
  242. Reiter RJ, 1980: The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr.Rev.* 1 109-131.

243. Reiter RJ, 1991: Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr.Rev.* 12 151-180.
244. Reiter RJ, 1995: Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol.* 16 383-415.
245. Reiter RJ, 2003: Melatonin: clinical relevance. *Best.Pract.Res Clin.Endocrinol.Metab* 17 273-285.
246. Reiter RJ, Hester RJ, 1966: Interrelationships of the pineal gland, the superior cervical ganglia and the photoperiod in the regulation of the endocrine systems of hamsters. *Endocrinology* 79 1168-1170.
247. Reiter RJ, Pablos MI, Agapito TT, Guerrero JM, 1996: Melatonin in the context of the free radical theory of aging. *Ann.N.Y Acad.Sci* 786 362-378.
248. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E, 2000: Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed.Sci.* 7 444-458.
249. Revel A, Raanani H, Younglai E, Xu J, Han R, Savouret JF, Casper RF, 2001: Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzo(a)pyrene. *Reprod Toxicol.* 15 479-486.
250. Robertson L, Bailey JL, Buhr MM, 1990: Effects of cold shock and phospholipase A2 on intact boar spermatozoa and sperm head plasma membranes. *Mol.Reprod.Dev.* 26 143-149.
251. Roca J, Hernandez M, Carvajal G, Vazquez JM, Martinez EA, 2006: Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J Anim Sci* 84 2692-2699.
252. Roca J, Rodriguez MJ, Gil MA, Carvajal G, Garcia EM, Cuello C, Vazquez JM, Martinez EA, 2005: Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *J.Androl* 26 15-24.
253. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ, 2004: Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 36 1-9.
254. Roemer K, Mahyar-Roemer M, 2002: The basis for the chemopreventive action of resveratrol. *Drugs Today (Barc.)* 38 571-580.
255. Roosen-Runge EC, 1973: Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis. *J Reprod.Fertil.* 35 339-348.
256. ROY A, BISHOP MW, 1954: Effect of glycine on the survival of bull spermatozoa in vitro. *Nature* 174 746-747.

- 
257. Saez F, Motta C, Boucher D, Grizard G, 1998: Antioxidant capacity of prostasomes in human semen. *Mol.Hum.Reprod.* 4 667-672.
  258. Said TM, Agarwal A, Sharma RK, Thomas AJ, Jr., Sikka SC, 2005: Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by beta-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Fertil.Steril.* 83 95-103.
  259. Sarabia L, Maurer I, Bustos-Obregon E, 2009: Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA. *Ecotoxicol.Environ.Saf* 72 663-668.
  260. Sareen D, van Ginkel PR, Takach JC, Mohiuddin A, Darjatmoko SR, Albert DM, Polans AS, 2006: Mitochondria as the primary target of resveratrol-induced apoptosis in human retinoblastoma cells. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 47 3708-3716.
  261. Sarlos P, Molnar A, Kokai M, Gabor G, Ratky J, 2002: Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Vet.Hung.* 50 235-245.
  262. Scott JW, Hawley SA, Green KA, Anis M, Stewart G, Scullion GA, Norman DG, Hardie DG, 2004: CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin.Invest* 113 274-284.
  263. Shannon P, Curson B, 1982: Kinetics of the aromatic L-amino acid oxidase from dead bovine spermatozoa and the effect of catalase on fertility of diluted bovine semen stored at 5 degrees C and ambient temperatures. *J Reprod.Fertil.* 64 463-467.
  264. Sharpe RM, 1998: The roles of oestrogen in the male. *Trends Endocrinol.Metab* 9 371-377.
  265. Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, Hurley RL, Witters LA, DePinho RA, Cantley LC, 2004: The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 101 3329-3335.
  266. Shier WT, 1979: Activation of high levels of endogenous phospholipase A2 in cultured cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 76 195-199.
  267. Shin S, Jeon JH, Park D, Jang MJ, Choi JH, Choi BH, Joo SS, Nahm SS, Kim JC, Kim YB, 2008: trans-Resveratrol relaxes the corpus cavernosum ex vivo and enhances testosterone levels and sperm quality in vivo. *Arch Pharm.Res* 31 83-87.
  268. Sies H, 1993: Strategies of antioxidant defense. *Eur.J Biochem.* 215 213-219.

- 
269. Silva EC, Cajueiro JF, Silva SV, Soares PC, Guerra MM, 2012: Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology* 77 1722-1726.
  270. Slanar O, Pelisek V, Vanecek J, 2000: Melatonin inhibits pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide-induced increase of cyclic AMP accumulation and  $[Ca^{2+}]_i$  in cultured cells of neonatal rat pituitary. *Neurochem.Int.* 36 213-219.
  271. Sliwa L, Stochmal E, 2001: [The effect of melatonin on directional motility of human sperm under in vitro conditions]. *Folia Med Cracov.* 42 123-128.
  272. Smital J, 2009: Effects influencing boar semen. *Anim Reprod.Sci.* 110 335-346.
  273. Soares SE, 2002: Ácidos fenólicos como antioxidantes (phenolic acids as antioxidants). *Rev Nutr* 15 71-81.
  274. Soede NM, Wetzels CC, Zondag W, Hazeleger W, Kemp B, 1995: Effects of a second insemination after ovulation on fertilization rate and accessory sperm count in sows. *J Reprod Fertil.* 105 135-140.
  275. Sonderman JP, Luebke JJ, 2008: Semen production and fertility issues related to differences in genetic lines of boars. *Theriogenology* 70 1380-1383.
  276. Spiteller G, 2006a: Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radic.Biol.Med.* 41 362-387.
  277. Spiteller G, 2006b: Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radic.Biol.Med* 41 362-387.
  278. Srivastava PN, Abou-Issa H, 1977: Purification and properties of rabbit spermatozoal acrosomal neuraminidase. *Biochem.J* 161 193-200.
  279. Srivastava PN, Zaneveld LJ, Williams WL, 1970: Mammalian sperm acrosomal neuraminidases. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 39 575-582.
  280. Stetson MH, Elliott JA, Menaker M, 1975: Photoperiodic regulation of hamster testis: circadian sensitivity to the effects of light. *Biol.Reprod.* 13 329-339.



- 
281. Stojanovic S, Sprinz H, Brede O, 2001: Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Arch Biochem.Biophys.* 391 79-89.
  282. Storey BT, 1997: Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol.Hum.Reprod.* 3 203-213.
  283. Suchankova G, Nelson LE, Gerhart-Hines Z, Kelly M, Gauthier MS, Saha AK, Ido Y, Puigserver P, Ruderman NB, 2009: Concurrent regulation of AMP-activated protein kinase and SIRT1 in mammalian cells. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 378 836-841.
  284. Sullivan JE, Brocklehurst KJ, Marley AE, Carey F, Carling D, Beri RK, 1994: Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett.* 353 33-36.
  285. Suter M, Riek U, Tuerk R, Schlattner U, Wallimann T, Neumann D, 2006: Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *J Biol.Chem.* 281 32207-32216.
  286. Swierstra EE, 1968: Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididymis. *Anat.Rec.* 161 171-185.
  287. Talbot JA, Reiter RJ, 1973: Influence of melatonin, 5-methoxytryptophol and pinealectomy on pituitary and plasma gonadotropin and prolactin levels in castrated adult male rats. *Neuroendocrinology* 13 164-172.
  288. Tamura H, Nakamura Y, Terron MP, Flores LJ, Manchester LC, Tan DX, Sugino N, Reiter RJ, 2008: Melatonin and pregnancy in the human. *Reprod.Toxicol.* 25 291-303.
  289. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ, 2007: One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 42 28-42.
  290. Tanabe T, Wada K, Okazaki T, Numa S, 1975: Acetyl-coenzyme-A carboxylase from rat liver. Subunit structure and proteolytic modification. *Eur.J Biochem.* 57 15-24.
  291. Tanyildizi S, Bozkurt T, 2003: Effects of acetylsalicylic acid and metamizol on hyaluronidase activity and sperm characteristics in rams. *Anim Reprod.Sci.* 76 195-204.

- 
292. Tanyildizi S, Bozkurt T, Üft O, Sakun F, 2006: In Vitro Effects of melatonin on Hyaluronidase Activity and Sperm Motility in Bull Semen. *Turk J Vet Anim Sci* 30 89-93.
  293. Tash JS, 1989: Protein phosphorylation: the second messenger signal transducer of flagellar motility. *Cell Motil.Cytoskeleton* 14 332-339.
  294. Thieblot L, Bars H, 1955: *Le Glande Pineale ou Epiphyse*. Paris: Maloine.
  295. Tilden AR, Becker MA, Amma LL, Arciniega J, McGaw AK, 1997: Melatonin production in an aerobic photosynthetic bacterium: an evolutionarily early association with darkness. *J Pineal Res* 22 102-106.
  296. Tomas-Zapico C, Coto-Montes A, 2005: A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res* 39 99-104.
  297. Torphy TJ, 1998: Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents. *Am J Respir.Crit Care Med* 157 351-370.
  298. Torre ML, Faustini M, Norberti R, Stacchezzini S, Maggi L, Maffeo G, Conte U, Vigo D, 2002: Boar semen controlled delivery system: storage and in vitro spermatozoa release. *J Control Release* 85 83-89.
  299. Toshimori K, 2003: Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. *Microsc.Res Tech.* 61 1-6.
  300. Towler MC, Fogarty S, Hawley SA, Pan DA, Martin DM, Morrice NA, McCarthy A, Galardo MN, Meroni SB, Cigorruga SB, Ashworth A, Sakamoto K, Hardie DG, 2008: A novel short splice variant of the tumour suppressor LKB1 is required for spermiogenesis. *Biochem.J* 416 1-14.
  301. Tremellen K, 2008: Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum.Reprod.Update.* 14 243-258.
  302. Turek FW, Desjardins C, Menaker M, 1976: Melatonin-induced inhibition of testicular function in adult golden hamsters. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 151 502-506.
  303. Turner N, Li JY, Gosby A, To SW, Cheng Z, Miyoshi H, Taketo MM, Cooney GJ, Kraegen EW, James DE, Hu LH, Li J, Ye JM, 2008: Berberine and its more biologically available derivative, dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I: a mechanism for the action of berberine to activate AMP-activated protein kinase and improve insulin action. *Diabetes* 57 1414-1418.
  304. Turrens JF, 2003: Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552 335-344.

305. Upreti GC, Jensen K, Oliver JE, Duganzich DM, Munday R, Smith JF, 1997: Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Anim Reprod.Sci.* 48 269-278.
306. van Ginkel PR, Darjatmoko SR, Sareen D, Subramanian L, Bhattacharya S, Lindstrom MJ, Albert DM, Polans AS, 2008: Resveratrol inhibits uveal melanoma tumor growth via early mitochondrial dysfunction. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 49 1299-1306.
307. van Ginkel PR, Sareen D, Subramanian L, Walker Q, Darjatmoko SR, Lindstrom MJ, Kulkarni A, Albert DM, Polans AS, 2007: Resveratrol inhibits tumor growth of human neuroblastoma and mediates apoptosis by directly targeting mitochondria. *Clin.Cancer Res.* 13 5162-5169.
308. van Vuuren RJ, Pitout MJ, van Aswegen CH, Theron JJ, 1992: Putative melatonin receptor in human spermatozoa. *Clin.Biochem.* 25 125-127.
309. Vanecek J, Vollrath L, 1989: Melatonin inhibits cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in the rat pituitary. *Brain Res* 505 157-159.
310. Venéreo GJR, 2002: Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. *Med Milit* 31 126-33.
311. Verma A, Kanwar KC, 1999: Effect of vitamin E on human sperm motility and lipid peroxidation in vitro. *Asian J Androl* 1 151-154.
312. Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K, 2002: Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57 149-179.
313. Viera AIQ, 2004: La Oxidación Lipídica y el Uso de Antioxidantes Sintéticos en Productos Cárnicos. *Rev.Énfasis Alimentación Año* 9.
314. Vigo D, Faustini M, Villani S, Orsini F, Bucco M, Chlapanidas T, Conte U, Ellis K, Torre ML, 2009: Semen controlled-release capsules allow a single artificial insemination in sows. *Theriogenology* 72 439-444.
315. Viviens-Roels B, Pevet P, 1993: Melatonin: presence and formation in invertebrates. *Experientia* 49 642-647.
316. Vyt P, Maes D, Dejonckheere E, Castryck F, Van SA, 2004: Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. *Reprod Domest Anim* 39 8-12.
317. Waberski D, Medings S, Dirksaen G, Weitze KF, Lewiding C, Hahn R, 1994a: Fertility of long term-stored boar semen: influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. *Anim Reprod.Sci.* 36 145-151.

318. Waberski D, Weitze KF, Lietmann C, Lubbert Zur LW, Bortolozzo FP, Willmen T, Petzoldt R, 1994b: The initial fertilizing capacity of longerm-stored liquid boar semen following pre- and postovulatory insemination. *Theriogenology* *41* 1367-1377.
319. Waberski D, Weitze KF, Rath D, Sallman HP, 1989: Effect of bovine serum albumin and zwitterionic buffers on stored liquid boar semen. *Zuchthygiene* *24* 128-133.
320. Waterhouse KE, De Angelis PM, Haugan T, Paulenz H, Hofmo PO, Farstad W, 2004: Effects of in vitro storage time and semen-extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry. *Theriogenology* *62* 1638-1651.
321. Waterhouse KE, Hofmo PO, Tverdal A, Miller RR, Jr., 2006: Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction* *131* 887-894.
322. Watson PF, 1955: Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod.Fertil.Dev.* *7* 871-891.
323. Watson PF, 1996: Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod Domest Anim* *31* 135-140.
324. Weitze KF, 1990: The use of long-term extender in pig AI-view of the international situation. *Pig News Information* *11* 23-26.
325. Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T, Carlson M, Carling D, 2003: LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr.Biol.* *13* 2004-2008.
326. Wu TW, Cheng FP, Chen IH, Yang CH, Tsai MY, Chang MH, Wang JH, Wu JT, 2013: The combinatorial effect of different Equex STM paste concentrations, cryoprotectants and the straw-freezing methods on the post-thaw boar semen quality. *Reprod Domest Anim* *48* 53-58.
327. Wurtman RJ, Axelrold J, Kelly DE, 1968: *The pineal*. Academic Press, New York and London 145-161.
328. Xiao B, Heath R, Saiu P, Leiper FC, Leone P, Jing C, Walker PA, Haire L, Eccleston JF, Davis CT, Martin SR, Carling D, Gamblin SJ, 2007: Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature* *449* 496-500.
329. Xu B, Hao Z, Jha KN, Digilio L, Urekar C, Kim YH, Pulido S, Flickinger CJ, Herr JC, 2007: Validation of a testis specific serine/threonine kinase [TSSK] family

- and the substrate of TSSK1 & 2, TSKS, as contraceptive targets. *Soc Reprod Fertil.Suppl* 63 87-101.
330. Xu B, Hao Z, Jha KN, Zhang Z, Urekar C, Digilio L, Pulido S, Strauss JF, III, Flickinger CJ, Herr JC, 2008: Targeted deletion of *Tssk1* and 2 causes male infertility due to haploinsufficiency. *Dev.Biol* 319 211-222.
331. Yamaguchi S, Funahashi H, Murakami T, 2009: Improved fertility in gilts and sows after artificial insemination of frozen-thawed boar semen by supplementation of semen extender with caffeine and CaCl<sub>2</sub>. *J Reprod Dev.* 55 645-649.
332. Yin J, Gao Z, Liu D, Liu Z, Ye J, 2008: Berberine improves glucose metabolism through induction of glycolysis. *Am J Physiol Endocrinol.Metab* 294 E148-E156.
333. Yoshinaga K, Toshimori K, 2003: Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation. *Microsc.Res Tech.* 61 39-45.
334. Yousef MI, Abdallah GA, Kamel KI, 2003: Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Anim Reprod.Sci.* 76 99-111.
335. Yuan H, Pang SF, 1991: [125I]Iodomelatonin-binding sites in the pigeon brain: binding characteristics, regional distribution and diurnal variation. *J Endocrinol.* 128 475-482.
336. Zheng J, Ramirez VD, 2000: Inhibition of mitochondrial proton FOF1-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *Br.J.Pharmacol.* 130 1115-1123.
337. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE, 2001: Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin.Invest* 108 1167-1174.
338. Zini R, Morin C, Bertelli A, Bertelli AA, Tillement JP, 1999: Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp.Clin.Res.* 25 87-97.
339. Zunino SJ, Storms DH, 2006: Resveratrol-induced apoptosis is enhanced in acute lymphoblastic leukemia cells by modulation of the mitochondrial permeability transition pore. *Cancer Lett.* 240 123-134.

# **Anexos**

---



**Anexo -1**

---





Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

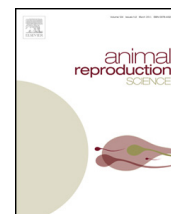
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

# Animal Reproduction Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/anireprosci](http://www.elsevier.com/locate/anireprosci)

## Inter- and intra-breed comparative study of sperm motility and viability in Iberian and Duroc boar semen during long-term storage in MR-A and XCell extenders



D. Martín-Hidalgo<sup>a</sup>, F.J. Barón<sup>b</sup>, A. Robina<sup>c</sup>, M.J. Bragado<sup>a</sup>,  
A. Hurtado de Llera<sup>a</sup>, L.J. García-Marín<sup>a</sup>, M.C. Gil<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Research Team of Intracellular Signaling and Technology of Reproduction (SINTREP), Veterinary School, University of Extremadura, Cáceres, Spain

<sup>b</sup> Biostatistics, Department of Preventive Medicine and Public Health, Medicine School, University of Málaga, Málaga, Spain

<sup>c</sup> Department of Anatomy, Cellular Biology and Zoology, Veterinary School, University of Extremadura, Cáceres, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 September 2012

Received in revised form 29 March 2013

Accepted 5 April 2013

Available online 12 April 2013

#### Keywords:

Boar  
CASA  
Breed  
MR-A  
XCell  
Storage

### ABSTRACT

During boar semen liquid preservation, extender is one of the factors that influence storage tolerance of spermatozoa. However, there are few studies about intra-breed variation in the preservation of semen quality during storage in different extenders. Similarly, boar breed is generally not considered a possible factor influencing variation in the semen storage tolerance in a particular extender. The aim of this study was to compare boar semen storage potential, in terms of the ability to maintain sperm viability and motility, of two currently used long-term extenders, MR-A and XCell. Extended semen from two breeds, Iberian and Duroc that had been stored at 17 °C for up to 7 days was used. Intra- and inter-breed effect was studied. On Days 1, 4 and 7 (Day 0 = day of semen collection), motility parameters and the percentage of total motile sperm and progressively motile sperm using a CASA system was evaluated. Viability (SYBR-14/PI) was evaluated by flow cytometry. Within each breed and for each storage day, there were differences between extenders, although semen tolerance to preservation was more influenced by the extender in the Iberian than in the Duroc breed. Neither breed nor extender influenced the percentage of viable spermatozoa during the storage time. Moreover, differences in motility parameters were observed between breeds, although the differences were greater when the XCell extender was used. In conclusion, both extender and breed influence motility characteristics of liquid-stored boar semen, so both aspects have to be considered in the design of comparative studies about stored boar semen quality from different breeds or with different extenders. Further studies are needed to corroborate these findings.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

During the storage of extended boar semen, a decrease in the fertility potential is an inevitable result of the natural spermatozoa aging process. The evaluation of the ability of a particular extender to preserve sperm quality during storage includes, among others, measurements of changes in motility, viability, pH, DNA integrity, acrosome intactness, mitochondrial activity, bacterial contamination

\* Corresponding author at: Research Team of Intracellular Signaling and Technology of Reproduction, Department of Animal Medicine, Veterinary School, University of Extremadura, Avda. de la Universidad, s/n, 10003 Cáceres, Spain. Tel.: +34 927257100x1303; fax: +34 927257110.  
E-mail addresses: [crgil@unex.es](mailto:crgil@unex.es), [cruzgila@gmail.com](mailto:cruzgila@gmail.com) (M.C. Gil).

and tyrosine phosphorylation (Boe-Hansen et al., 2005; De Ambrogi et al., 2006; Dubé et al., 2004; Huo et al., 2002a,b; Kommisrud et al., 2002; Vyt et al., 2004; Waterhouse et al., 2004). Among the different indicators of sperm quality during storage, motility has been one of the most evaluated, especially in AI centers. Motility analysis by computer-assisted semen analysis (CASA) systems has been shown to be accurate, precise and repeatable (Amann and Katz, 2004). Additionally, the intactness of the sperm plasma membrane is a prerequisite for suitable sperm metabolism and function. It plays an important role in maintaining sperm viability during storage, so viability is another sperm indicator of sperm quality (Dubé et al., 2004; Waberski et al., 2011). Currently, compared to traditional microscopy methods, flow cytometry assessment of sperm quality has greatly improved the accuracy, objectivity and reproducibility of semen evaluation (Waterhouse et al., 2004).

The storage tolerance of spermatozoa depends, among other factors, on the extender, storage time, storage temperature, semen quality and dilution concentration (Haugan et al., 2007; Martín-Hidalgo et al., 2011; Paulenz et al., 2000; Waterhouse et al., 2004). The nature of the preservation solution is one of the factors that influence the length of time that liquid porcine semen can be stored while maintaining optimal fertility (Kuster and Althouse, 1999). Several studies have been conducted to analyze the effect of extender type and storage time on *in vitro* semen characteristics, but not many of them have compared motility parameters measured by CASA system. These studies are of interest because CASA motility parameters have been correlated to fertilizing capacity of ejaculates (Broekhuijse et al., 2012). The results of several studies indicate that extender influences sperm quality parameters during storage, including motility (De Ambrogi et al., 2006; Dubé et al., 2004; Estienne et al., 2007; Kuster and Althouse, 1999; Vyt et al., 2004; Waterhouse et al., 2004). However, not all male semen samples interact in the same way with the extenders. Variation among boars in *in vitro* semen storage tolerance has been reported (Kommisrud et al., 2002; Paulenz et al., 2000; Waterhouse et al., 2004), and it has therefore been proposed that the extenders also need to be adapted to individual differences among animals (Gadea, 2003; Levis, 2000). In addition, most comparative studies of extenders use several breeds or hybrid boars; in others studies breed is not specified. But even though there are breed differences in semen quality (Ciereszko et al., 2000; Conlon and Kennedy, 1978; Kennedy and Wilkins, 1984; Smital, 2009; Sonderman and Luebbe, 2008), in general, comparative extender studies tend not to consider breed as a possible source of variation in the ability of different extenders to preserve sperm quality during storage, so results from different studies might not be comparable or mean values not be representative of the sample values as a whole. Thus, the aim of this study was to compare intra- and inter-breed variation in sperm motility (measured by CASA system) and viability (by flow cytometry) in boar semen from Duroc and Iberian pigs, two breeds extensively used in pork production systems in the southwest of Spain. Semen was diluted in two long-term extenders, MR-A and XCell, and stored for 7 days at 17 °C.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals, sample collection and processing of ejaculates

Ejaculates from nine Duroc (21 ejaculates) and six Iberian (28 ejaculates) boars, 2–4 y of age, were used in this study. Natural breeding and artificial insemination using preserved liquid semen from these boars demonstrated their fertility. These boars came from a semi-intensive pig production system located in western Spain. All boars were kept in individual pens on the farm in an environment controlled by a thermostatically controlled cooling system and received the same diet. The trial was conducted between April and June 2011.

Semen was collected in the morning, once per week, using the “gloved hand”-technique and immediately placed in a water bath at 38 °C at the farm laboratory. Samples from each ejaculate were evaluated for subjective motility, morphology and concentration parameters (Spermacue, Minitüb Ibérica S. L., Spain) following established protocols (Martín Rillo et al., 1996), and only ejaculates with at least 70% motile spermatozoa, 80% morphologically normal spermatozoa and greater than  $10 \times 10^9$  total spermatozoa were used. Each ejaculate was split into two aliquots, and dilutions were made within 15 min after semen collection using XCell (IMV Technologies, 61300 L'Aigle, France) or MR-A (Kubus, Madrid, Spain) extenders to a final concentration of  $35 \times 10^6$  cells/mL. The two commercially available extenders were prepared according to the manufacturers' instructions. The extended semen was then dispensed into 80 mL plastic tubes (Import-Vet S.A., Centelles, Spain), and three bottles of each ejaculate diluted in MR-A or XCell were placed in a semen storage unit at 20–22 °C for approximately 90 min for transit to the Veterinary Faculty laboratory. Once the semen reached 22–25 °C, doses were stored in a refrigerated incubator (FOC 225i, VELP Scientifica, Usmate, Italy) at 17 °C for 7 days (Day of collection = Day 0). On Days 1, 4 and 7, for each extender, a sample was removed from one bottle and analyzed for sperm motility (using a CASA system) and viability (by flow cytometry).

### 2.2. Assessment of sperm motility

Immediately after gentle mixing, 1 mL of stored semen was taken from each bottle and examined for a motility pattern using a CASA system (ISAS®, Proiser R+D, Paterna, Valencia, Spain) following incubation at 38 °C for 30 min in a water bath. A 2.5 µL aliquot of the sample was placed in a pre-warmed counting chamber (Leja®, Luzernestraat, The Netherlands). Sperm motility was assessed with a microscope equipped with a 10× negative-phase contrast objective and a heated stage at 38 °C. At least 300 spermatozoa were analyzed for each sample. After acquiring representative fields, the following sperm motility descriptors were recorded: total motile spermatozoa (% TMS), progressively motile spermatozoa (% PMS, STR > 0.80, 80%), VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH and BCF. Spermatozoa with an average path velocity (VAP) > 10 µm/s were considered motile, spermatozoa

deviating < 10% from a straight line were designated as linearly motile and spermatozoa with a radius < 25 μm were classified as circularly motile (Saravia et al., 2005).

### 2.3. Assessment of sperm viability

This parameter was evaluated using the LIVE/DEAD Sperm Viability Kit (Leiden, The Netherlands) (Aparicio et al., 2007). Briefly, 5 μL of SYBR-14 (2 μmol/L) and 10 μL of propidium iodide (PI, 5 μmol/L) were added to 500 μL of diluted semen sample in isotonic buffered diluent (Coulter Isoton II Diluent, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) and incubated for 20 min at room temperature. After incubation, the cells were analyzed, and the results were expressed as the percentage of SYBR-14-positive and PI-negative spermatozoa.

Flow cytometry analyses were performed using a Coulter EPIC XL flow cytometer (Beckman Coulter Ltd., 200 mV argon ion laser, 488 nm, 10,000 gated events per sample). Flow cytometric data were analyzed using a FACStation computer and EXPO™ 32 ADC software (Beckman Coulter, Inc.).

### 2.4. Statistical analysis

A power analysis was conducted to determine the appropriate number of animals and samples. The mean and standard error of the mean were calculated for descriptive analysis, and the standard deviation and intra-class correlation coefficient was calculated to show the variability among boars. The effects of the extender (MR-A and XCell), storage time (1, 4 and 7 d) and breed (Duroc and Iberian) on sperm motility and viability were analyzed statistically. The effect of storage time on the differences between extenders was also studied. Q–Q plots were used to check for departures from the normal distribution. The sperm viability variable did not satisfy the normality requirement for a parametric analysis of variance. Therefore, non-parametric analyses were performed using a Kruskal–Wallis test. When statistically significant differences were detected using this test, the non-parametric Mann–Whitney U-test was used to compare pairs of values directly.

The effects of the extender, breed and storage time on the motility variables was assessed using a General Linear Model. A mixed-effects model (with boars and ejaculates within boars as random effects and extender, storage time and breed as fixed effects) was applied to the experimental design. Pairwise comparisons of the significant fixed effects were performed using t-tests. When there was a significant effect of storage time on differences between extenders, we used Fisher's Least Significant Difference test for comparing storage days. When the results lacked normality and the validity of statistical estimates were unclear, a non-parametric bootstrap technique was used to confirm the results.

All statistical analyses were performed using the SPSS version 15 for Windows statistical package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and the library Bootstrap R (S6 Plus) Functions R package version 1.2–42 from the statistical package

**Table 1**  
Effects of breed and extender on seminal characteristics on specific days after collection.

Storage day	Extender-breed	VCL (μm/s)	VSL (μm/s)	VAP (μm/s)	LIN	STR	WOB	ALH (μm)	BCF (μm)	TMS (%)	PMS (%)	VS (%)
Day 1	MRA-D	57.93 ± 3.76 <sup>a,1</sup>	43.41 ± 2.74 <sup>a,1</sup>	51.04 ± 3.10 <sup>a,1</sup>	0.75 ± 0.02 <sup>a,1</sup>	0.84 ± 0.01 <sup>a,1</sup>	0.88 ± 0.01 <sup>a,1</sup>	1.66 ± 0.14 <sup>a,1</sup>	7.86 ± 0.18 <sup>a,1</sup>	89.14 ± 3.10 <sup>a,1</sup>	65.11 ± 2.88 <sup>a,1</sup>	94.71 ± 2.43 <sup>a,1</sup>
	MRA-Ib	73.39 ± 3.75 <sup>a,2</sup>	51.00 ± 2.65 <sup>a,2</sup>	61.19 ± 2.99 <sup>a,2</sup>	0.73 ± 0.01 <sup>a,2</sup>	0.80 ± 0.01 <sup>a,2</sup>	0.90 ± 0.01 <sup>a,2</sup>	2.31 ± 0.14 <sup>a,2</sup>	7.47 ± 0.16 <sup>a,2</sup>	80.88 ± 2.68 <sup>a,2</sup>	53.68 ± 2.50 <sup>a,2</sup>	95.35 ± 1.88 <sup>a,1</sup>
	XCell-D	68.49 ± 3.65 <sup>b,1</sup>	50.90 ± 2.46 <sup>b,1</sup>	59.73 ± 2.78 <sup>b,1</sup>	0.73 ± 0.02 <sup>a,1</sup>	0.83 ± 0.01 <sup>a,1</sup>	0.87 ± 0.01 <sup>a,1</sup>	1.95 ± 0.14 <sup>b,1</sup>	7.83 ± 0.17 <sup>a,1</sup>	88.41 ± 2.07 <sup>a,1</sup>	63.72 ± 2.30 <sup>a,1</sup>	93.98 ± 2.43 <sup>a,1</sup>
	XCell-Ib	86.56 ± 3.75 <sup>b,2</sup>	64.29 ± 2.65 <sup>b,2</sup>	75.21 ± 2.99 <sup>b,2</sup>	0.74 ± 0.01 <sup>b,1</sup>	0.84 ± 0.01 <sup>b,1</sup>	0.87 ± 0.01 <sup>b,1</sup>	2.44 ± 0.14 <sup>b,2</sup>	7.30 ± 0.12 <sup>a,2</sup>	89.34 ± 2.31 <sup>b,1</sup>	66.08 ± 2.47 <sup>b,1</sup>	93.77 ± 1.19 <sup>a,1</sup>
Day 4	MRA-D	81.90 ± 3.76 <sup>a,1</sup>	47.99 ± 2.74 <sup>a,1</sup>	64.30 ± 3.10 <sup>a,1</sup>	0.59 ± 0.01 <sup>a,1</sup>	0.73 ± 0.01 <sup>a,1</sup>	0.79 ± 0.01 <sup>a,1</sup>	2.77 ± 0.14 <sup>a,1</sup>	7.39 ± 0.18 <sup>a,1</sup>	93.28 ± 3.10 <sup>a,1</sup>	48.33 ± 2.88 <sup>a,1</sup>	93.52 ± 3.21 <sup>a,1</sup>
	MRA-Ib	86.93 ± 3.75 <sup>a,1</sup>	54.89 ± 2.65 <sup>a,2</sup>	69.93 ± 2.99 <sup>a,1</sup>	0.64 ± 0.02 <sup>a,2</sup>	0.77 ± 0.01 <sup>a,2</sup>	0.81 ± 0.01 <sup>a,2</sup>	2.85 ± 0.14 <sup>a,1</sup>	7.26 ± 0.16 <sup>a,1</sup>	87.11 ± 2.68 <sup>a,2</sup>	52.55 ± 2.50 <sup>a,1</sup>	94.07 ± 1.85 <sup>a,1</sup>
	XCell-D	93.92 ± 3.65 <sup>b,1</sup>	53.36 ± 2.46 <sup>b,1</sup>	71.23 ± 2.78 <sup>b,1</sup>	0.57 ± 0.02 <sup>a,1</sup>	0.72 ± 0.01 <sup>b,1</sup>	0.76 ± 0.01 <sup>b,1</sup>	3.27 ± 0.14 <sup>b,1</sup>	7.04 ± 0.17 <sup>b,1</sup>	92.46 ± 2.07 <sup>a,1</sup>	46.31 ± 2.30 <sup>a,1</sup>	93.05 ± 3.35 <sup>a,1</sup>
	XCell-Ib	99.81 ± 3.75 <sup>b,1</sup>	64.79 ± 2.65 <sup>b,2</sup>	79.77 ± 2.99 <sup>b,2</sup>	0.64 ± 0.01 <sup>a,2</sup>	0.79 ± 0.01 <sup>a,2</sup>	0.80 ± 0.01 <sup>a,2</sup>	3.28 ± 0.14 <sup>b,1</sup>	7.15 ± 0.12 <sup>a,1</sup>	91.57 ± 2.31 <sup>a,1</sup>	58.66 ± 2.47 <sup>b,2</sup>	93.63 ± 1.22 <sup>a,1</sup>
Day 7	MRA-D	76.40 ± 3.76 <sup>a,1</sup>	44.28 ± 2.74 <sup>a,1</sup>	59.62 ± 3.10 <sup>a,1</sup>	0.58 ± 0.01 <sup>a,1</sup>	0.72 ± 0.01 <sup>a,1</sup>	0.78 ± 0.01 <sup>a,1</sup>	2.64 ± 0.14 <sup>a,1</sup>	7.01 ± 0.17 <sup>a,1</sup>	79.57 ± 3.10 <sup>a,1</sup>	40.11 ± 2.88 <sup>a,1</sup>	86.89 ± 2.62 <sup>a,1</sup>
	MRA-Ib	88.99 ± 3.75 <sup>a,2</sup>	54.34 ± 2.65 <sup>a,2</sup>	68.46 ± 2.99 <sup>a,2</sup>	0.60 ± 0.02 <sup>a,1</sup>	0.76 ± 0.01 <sup>a,2</sup>	0.77 ± 0.01 <sup>a,2</sup>	3.10 ± 0.14 <sup>a,2</sup>	6.94 ± 0.16 <sup>a,1</sup>	74.98 ± 2.68 <sup>a,1</sup>	43.79 ± 2.50 <sup>a,1</sup>	93.22 ± 1.78 <sup>a,2</sup>
	XCell-D	87.60 ± 3.65 <sup>b,1</sup>	51.54 ± 2.46 <sup>b,1</sup>	66.78 ± 2.78 <sup>b,1</sup>	0.58 ± 0.02 <sup>a,1</sup>	0.74 ± 0.01 <sup>a,1</sup>	0.76 ± 0.01 <sup>a,1</sup>	3.07 ± 0.14 <sup>b,1</sup>	7.04 ± 0.17 <sup>b,1</sup>	83.33 ± 2.07 <sup>a,1</sup>	44.80 ± 2.30 <sup>b,1</sup>	89.63 ± 2.55 <sup>a,1</sup>
	XCell-Ib	106.98 ± 3.82 <sup>b,2</sup>	67.21 ± 2.70 <sup>b,2</sup>	81.25 ± 3.04 <sup>b,2</sup>	0.62 ± 0.01 <sup>a,2</sup>	0.80 ± 0.01 <sup>b,2</sup>	0.76 ± 0.01 <sup>b,2</sup>	3.73 ± 0.14 <sup>b,2</sup>	7.22 ± 0.12 <sup>b,1</sup>	86.87 ± 2.35 <sup>b,2</sup>	57.55 ± 2.52 <sup>b,2</sup>	94.53 ± 1.19 <sup>a,2</sup>

Values are mean ± standard error of the mean. D: Duroc breed; Ib: Iberian breed; TMS indicates percentage of total motile sperm; PMS, percentage of progressively motile sperm; VS, percentage of viable spermatozoa with an intact plasma membrane (SYBR-14 + / PI -). <sup>a,b</sup>For each breed and day, comparisons are made between extenders. Values with different superscripts are different (P < 0.05); <sup>1,2</sup>For each extender and day, comparisons are made between breeds. Values with different superscripts are different (P < 0.05).

**Table 2**

For each parameter, variability observed among boars.

	A	B	C	D
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	0.00 (0.0%)	7.53 (20.2%)	6.90 (16.2%)	7.53 (20.2%)
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	4.43 (27.1%)	4.56 (16.1%)	4.42 (12.3%)	4.56 (16.0%)
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	3.93 (16.4%)	5.02 (15.2%)	3.89 (7.5%)	5.02 (15.2%)
LIN	0.02 (13.0%)	0.04 (20.6%)	0.04 (22.1%)	0.03 (20.6%)
STR	0.02 (18.3%)	0.03 (23.8%)	0.04 (32.7%)	0.03 (23.8%)
WOB	0.00 (1.6%)	0.02 (21.9%)	0.00 (0.0%)	0.02 (21.9%)
ALH ( $\mu\text{m}$ )	0.00 (0.0%)	0.32 (23.3%)	0.31 (24.9%)	0.31 (23.3%)
BCF ( $\mu\text{m}$ )	0.00 (0.0%)	0.00 (0.0%)	0.30 (12.7%)	0.00 (0.0%)
TMS (%)	2.72 (8.2%)	2.56 (13.9%)	0.00 (0.0%)	2.56 (13.9%)
PMS (%)	3.54 (11.8%)	5.47 (25.7%)	5.71 (18.2%)	5.47 (25.7%)
VS (%)	0.00 (0.0%)	0.00 (0.0%)	0.00 (0.0%)	0.00 (0.0%)

Values are standard deviation and intraclass correlation coefficient (in brackets). A: for Duroc breed, results of comparative study of extenders; B: for Iberian breed, results of comparative study of extenders; C: for MRA extender, results of comparative study of breeds; D: for XCell extender, results of comparative study of breeds; TMS indicates percentage of total motile sperm; PMS, percentage of progressively motile sperm; VS, percentage of viable spermatozoa with an intact plasma membrane (SYBR-14 +/PI –).

R 2.6.11(R Development Core Team, 2010). Statistical significance was considered at  $P < 0.05$ .

### 3. Results

Table 1 shows intra- and inter-breed comparative results. Table 2 shows among boar variability results.

In Duroc boars, the study of the extender by storage day interaction revealed that, for each day of storage, there were significant differences between extenders for the VCL, VSL, VAP and ALH parameters, and the largest values were observed for XCell. Moreover, differences between extenders observed for those parameters were independent of the day of storage (data not shown). No significant differences between extenders were observed for LIN and STR. For the viable, TMS and PMS percentages, a difference was only observed for the latter parameter on Day 7 ( $P = 0.03$ ), with the greatest value observed for XCell.

According to the effects of the extender on seminal characteristics on specific days after collection for the Iberian breed only WOB and the live sperm percentage showed no differences between extenders throughout the storage period. These differences were observed on all days (for the VCL, VSL and VAP parameters) or specific days of storage (for the LIN, STR, BCF and ALH parameters), with the greatest value observed for XCell. The PMS percentage also varied over the entire storage period; in this case and for the ALH parameter, the differences were dependent on the day of storage ( $P = 0.04$  and  $P = 0.01$ , respectively, data not shown). The PMS and the TMS percentages were greater in the XCell extender.

In both breeds, the VCL, VSL, VAP and ALH parameters differed the most between extenders, but it was observed that, except for ALH, these differences were greatest in the Iberian breed. Furthermore, the TMS and PMS percentage differences between extenders were minor in the Duroc breed, at least on Days 1 and 4, but were of major difference in the Iberian breed, especially on Days 1 and 7.

The fact that the degree of the differences between extenders varied by breed could mean that the seminal characteristics in MRA, XCell or both extenders were different in one or both breeds. Therefore, whether these characteristics were different between breeds was evaluated for

each extender (Table 1). In MRA, all but the WOB parameter were significantly different between breeds on all days (VSL, STR) or on specific days of storage. VCL, VSL, VAP and ALH were greater in the Iberian breed for all days of storage. In contrast, the TMS percentage, which was significantly different on Days 1 and 4, was greatest in the Duroc breed. The viable sperm percentage was only different on Day 7, with the greatest value observed for the Iberian breed.

In the XCell extender, all CASA parameters and indexes were significantly different between breeds on all days (VAP, VSL) or on specific days of storage, with the greatest values observed in the Iberian breed. The viable sperm percentage was only different on Day 7, with the greatest value again observed for the Iberian breed.

The differences between breeds were also influenced by the extender; for example, these differences were greater in XCell, particularly for VCL, VSL, VAP and PMS percentages (except for Day 1 for the PMS percentage). When MR-A was used, however, major differences between breeds were observed in the TMS percentage, which were not observed when the XCell extender was used.

### 4. Discussion

Most of the published studies comparing extenders used several breeds, hybrid boars or breed was not specified. Between-breed differences in semen quality and boar fertility have been demonstrated previously (Ciereszko et al., 2000; Conlon and Kennedy, 1978; Kennedy and Wilkins, 1984; Smital, 2009; Sonderman and Luebbe, 2008). In the study by Sonderman and Luebbe (2008) boar breeds also differed in the sustainability of motility in extended semen stored for 5 days. However, it is not well known whether there is variation among breeds concerning the preservation of semen quality during storage in a particular extender or whether there are differences among extenders within a particular breed. In the present study, differences were found between extenders for each breed. However, certain breed particularities were observed. In this regard, sperm motility characteristics during storage were more greatly influenced by the extender in the Iberian than in Duroc breed; not only was the number of parameters showing differences between extenders greater in

Iberian pigs, but the quantitative differences between extenders were also greater in this breed. For example, when using XCell, a larger increase in the TMS and PMS percentages on Day 7 (12 and 13.8 units, respectively) was observed in the Iberian breed compared to the increase observed in the Duroc breed only in the PMS percentage (only 4.7 units for PMS percentage; TMS was not significantly different between extenders in the Duroc breed). Thus, the XCell extender appears to be a more desirable choice for preserving seminal quality after long-term storage. Overall, the results of the present study support the idea of adapting the extender to each particular breed.

The only parameter that did not differ between extenders in both breeds was viable sperm percentage. In an analysis of data from a large number of boars from different AI studs, Waberski et al. (2011) did not detect significant changes in membrane integrity as assessed by flow cytometry between 1 and 3 days of storage. In the present study, significant changes were not detected even at Day 7 of storage. It is possible that differences in viability became evident only after a longer storage time.

It is a fact that there is variation among boars in terms of the preservation of semen quality during storage (Waberski et al., 1994; Waterhouse et al., 2004). It has been speculated that this variation arises from individual genetic variations that lead to distinct differences in sperm characteristics and seminal plasma (Kommissrud et al., 2002; Waterhouse et al., 2004). This variation has also been observed in the present study, and, except for the VSL and VAP parameters, it was greater in Iberian than Duroc pigs, reflecting a greater influence of the extender in the Iberian breed.

Observation of within-breed differences between extenders in the present study suggested that there could be, for each extender, differences between breeds, as was observed in other studies (Boe-Hansen et al., 2005; Haugan et al., 2005). Perhaps a genetic component might be responsible for the breed differences in sperm characteristics (Hoflack et al., 2007). In the present study, within each extender and according to the storage day, differences were observed between breeds for each parameter. What both extenders had in common was that, except for the TMS percentage on Days 1 and 4 in MR-A, the values were greater in the Iberian breed. In addition, certain extender particularities were observed in the sense that the quantitative differences between breeds were greater in XCell, except for the TMS percentage. In short, the magnitude of the differences between breeds was also influenced by extender. As described in the Materials and methods section, ejaculate dilutions were made within 15 min after semen collection, so it cannot be excluded that there was an effect of breed *per se* in motility differences between breeds. However, the more interesting results in the present study about this aspect is that, depending on the extender used, extent of differences between breeds can differ.

Because motility assessed by CASA systems is increasingly used to evaluate seminal quality during storage, several practical implications can be deduced from results of the present study. First, studies that aim to compare several seminal extenders should analyze one particular breed because in the present study it was shown that

the extender behavior in each breed is different. Similarly, studies aiming to compare seminal characteristics between breeds must consider that these differences can be influenced by the extender, and extender should be specified. Likewise, studies that compare the effect of different treatments on seminal characteristics should be assessed in a particular breed, and the breed and extender used in the present study should be specified so that different studies can be compared. These results can explain to some extent how studies comparing the same extenders obtain different results, even though experimental conditions are similar. In this sense, Waberski et al. (2011) pointed out the need for a standardization of experimental conditions when storage effects in diluted boar semen are assessed.

Computer-assisted semen analysis (CASA) system objectively evaluates multiple kinetic parameters that some investigators have correlated with individual male fertility (Broekhuijse et al., 2012; Farrell et al., 1998; Hirano et al., 2001; Holt et al., 1997; Tardif et al., 1999). Broekhuijse et al. (2012) in a recent study involving a data set of 45,000 records found a significant relationship between CASA parameters and farrowing rate and total number of piglets born, proposing CASA system as a valuable tool for selecting boar ejaculates. Because semen extender influences sperm motility, the kind of studies involving large data sets from several farms focused on the correlation between CASA motility parameters and fertility, should include the extender as a semen-related source of variation, if different farms are using different extenders.

In summary, male Duroc and Iberian boar semen samples that were stored for 7 days at 17 °C differ in terms of storage tolerance when diluted with either MR-A or XCell extenders, as indicated by modifications in sperm motility. In addition, this tolerance also differs according to the extender used for a given breed.

## Acknowledgements

This work was supported by National Grant AGL2010-15188 (from the Spanish Ministry of Education and Science) and regional Grant PRI09A077 and GR10156 (from the Gobierno de Extremadura, Spain). D. Martín-Hidalgo received a Ph D fellowship award from the Gobierno de Extremadura-European Social Fund, Spain.

## References

- Amann, R.P., Katz, D.F., 2004. Reflections on CASA after 25 years. *J. Androl.* 25, 317–325.
- Aparicio, I.M., Bragado, M.J., Gil, M.C., Garcia-Herreros, M., Gonzalez-Fernandez, L., Tapia, J.A., Garcia-Marin, L.J., 2007. Phosphatidylinositol 3-kinase pathway regulates sperm viability but not capacitation on boar spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 1035–1042.
- Boe-Hansen, G.B., Ersboll, A.K., Greve, T., Christensen, P., 2005. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology* 63, 2006–2019.
- Broekhuijse, M.L., Sostaric, E., Feitsma, H., Gadella, B.M., 2012. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *J. Anim. Sci.* 90, 779–789.
- Ciereszko, A., Ottobre, J.S., Glogowski, J., 2000. Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. *Anim. Reprod. Sci.* 64, 89–96.
- Conlon, P.D., Kennedy, B.W., 1978. A comparison of crossbred and purebred boars for semen and reproductive characteristics. *Can. J. Anim. Sci.* 58, 63–70.

- De Ambrogi, M., Ballester, J., Saravia, F., Caballero, I., Johannisson, A., Wallgren, M., Andersson, M., Rodriguez-Martinez, H., 2006. Effect of storage in short- and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. *Int. J. Androl.* 29, 543–552.
- Dubé, C., Beaulieu, M., Reyes-Moreno, C., Guillemette, C., Bailey, J.L., 2004. Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. *Theriogenology* 62, 874–886.
- Estienne, M.J., Harper, A.F., Day, J.L., 2007. Characteristics of sperm motility in boar semen diluted in different extenders and stored for seven days at 18 degrees C. *Reprod. Biol.* 7, 221–231.
- Farrell, P.B., Presicce, G.A., Brockett, C.C., Foote, R.H., 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 49, 871–879.
- Gadea, J., 2003. Review: semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Span. J. Agric. Res.* 1, 17–27.
- Haugan, T., Reksen, O., Grohn, Y.T., Gaustad, A.H., Hofmo, P.O., 2005. A retrospective study on effects of storage time of liquid boar semen on reproductive performance in Norwegian swine. *Theriogenology* 64, 891–901.
- Haugan, T., Gaustad, A.H., Reksen, O., Grohn, Y.T., Hofmo, P.O., 2007. Fertility results of artificial inseminations performed with liquid boar semen stored in X-Cell vs BTS extender. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 94–99.
- Hirano, Y., Shibahara, H., Obara, H., Suzuki, T., Takamizawa, S., Yamaguchi, C., Tsunoda, H., Sato, I., 2001. Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. *J. Assist. Reprod. Genet.* 18, 213–218.
- Hoflack, G., Opsomer, G., Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., de Kruif, A., Duchateau, L., 2007. Comparison of computer-assisted sperm motility analysis parameters in semen from Belgian blue and Holstein-Friesian bulls. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 153–161.
- Holt, C., Holt, W.V., Moore, H.D., Reed, H.C., Curnock, R.M., 1997. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J. Androl.* 18, 312–323.
- Huo, L.J., Ma, X.H., Yang, Z.M., 2002a. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology* 58, 1349–1360.
- Huo, L.J., Yue, K.Z., Yang, Z.M., 2002b. Characterization of viability, mitochondrial activity, acrosomal integrity and capacitation status in boar sperm during in vitro storage at different ambient temperatures. *Reprod. Fertil. Dev.* 14, 509–514.
- Kennedy, B.W., Wilkins, J.N., 1984. Boar, breed and environmental factors influencing semen characteristics of boars used in artificial insemination. *Can. J. Anim. Sci.* 64, 833–843.
- Kommisrud, E., Paulenz, H., Sehested, E., Grevle, I.S., 2002. Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta Vet. Scand.* 43, 49–55.
- Kuster, C.E., Althouse, G.C., 1999. The fecundity of porcine semen stored for 2 to 6 days in Androhep and X-CELL extenders. *Theriogenology* 52, 365–376.
- Levis, D.G., 2000. Liquid boar semen production: current extender technology for long-term storage and where do we go from here! In: Johnson, L.A., Guthrie, H.D. (Eds.), *Semen Boar Preservation IV*. Allen Press Inc., Lawrence, KS, United States, pp. 121–128.
- Martín-Hidalgo, D., Baron, F.J., Bragado, M.J., Carmona, P., Robina, A., Garcia-Marin, L.J., Gil, M.C., 2011. The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 °C. *Theriogenology* 75, 1550–1560.
- Martín Rillo, S., Martínez, E., García Artiga, C., De Alba, C., 1996. Boar semen evaluation in practice. *Reprod. Domest. Anim.* 31, 519–526.
- Paulenz, H., Kommisrud, E., Hofmo, P., 2000. Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. *Reprod. Domest. Anim.* 35, 83–87.
- Development Core Team, R., 2010. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Saravia, F., Wallgren, M., Nagy, S., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H., 2005. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. *Theriogenology* 63, 1320–1333.
- Smital, J., 2009. Effects influencing boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 110, 335–346.
- Sonderman, J.P., Luebke, J.J., 2008. Semen production and fertility issues related to differences in genetic lines of boars. *Theriogenology* 70, 1380–1383.
- Tardif, S., Laforest, J.P., Cormier, N., Bailey, J.L., 1999. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology* 52, 447–459.
- Vyt, P., Maes, D., Dejonckheere, E., Castryck, F., Van Soom, A., 2004. Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. *Reprod. Domest. Anim.* 39, 8–12.
- Waberski, D., Meding, S., Dirksen, G., Weitze, K.F., Leiding, C., Hahn, R., 1994. Fertility of long-term-stored boar semen: influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36, 145–151.
- Waberski, D., Henning, H., Petrunina, A.M., 2011. Assessment of storage effects in liquid preserved boar semen. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 45–48.
- Waterhouse, K.E., De Angelis, P.M., Haugan, T., Paulenz, H., Hofmo, P.O., Farstad, W., 2004. Effects of in vitro storage time and semen-extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry. *Theriogenology* 62, 1638–1651.

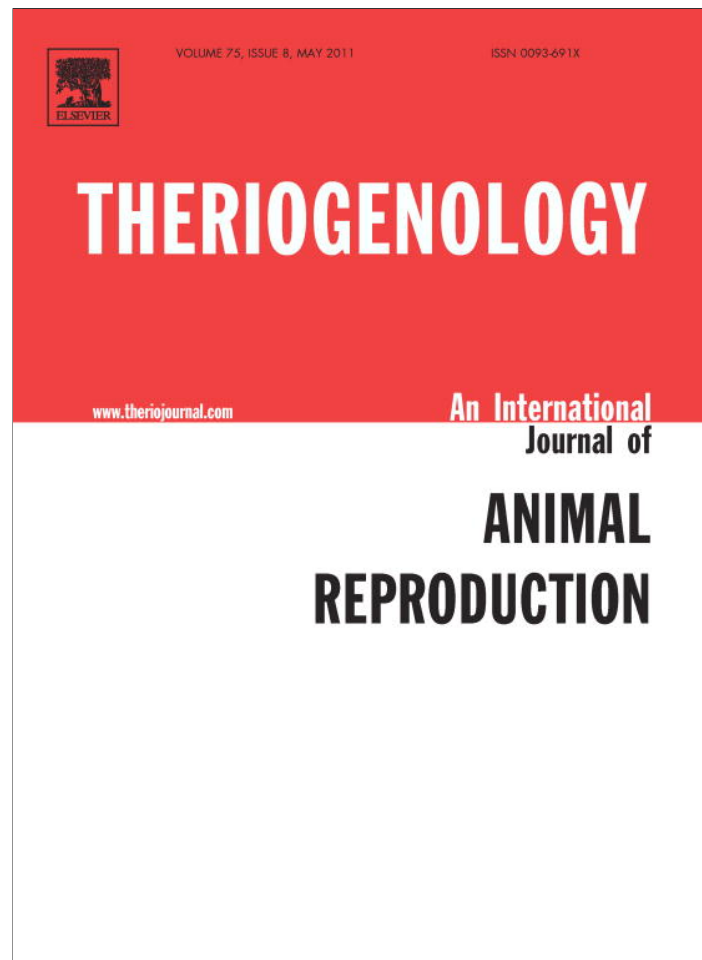




**Anexo-2**



Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Theriogenology 75 (2011) 1550–1560

Theriogenology

[www.theriojournal.com](http://www.theriojournal.com)

## The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 °C

D. Martín-Hidalgo<sup>a</sup>, F.J. Barón<sup>b</sup>, M.J. Bragado<sup>a</sup>, P. Carmona<sup>a</sup>, A. Robina<sup>c</sup>,  
L.J. García-Marín<sup>a</sup>, M.C. Gil<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Research Team of Intracellular Signaling and Technology of Reproduction (SINTREP), Veterinary School, University of Extremadura, Cáceres, Spain*

<sup>b</sup> *Biostatistics, Department of Preventive Medicine and Public Health, Medicine School, University of Málaga, Málaga, Spain*

<sup>c</sup> *Department of Anatomy, Cellular Biology and Zoology, Veterinary School, University of Extremadura, Cáceres, Spain*

Received 19 August 2010; received in revised form 14 December 2010; accepted 19 December 2010

### Abstract

Melatonin (MLT) is an efficient antioxidant that protects cells and tissues and initiates a host of receptor-mediated effects. In order to enhance the life span of refrigerated boar semen, our aim was to evaluate the effects of addition of 1  $\mu$ M MLT to commercially produced pig semen (33 seminal doses from 14 boars) that had been preserved at 17 °C for 7 days. Samples without MLT served as controls. On Days 1, 4 and 7, we evaluated motility parameters and the percentage of total motile and progressively motile spermatozoa by a computer-aided sperm analysis system. Viability (SYBR-14/PI), acrosomal status (FITC-PNA/PI), membrane fluidity (M-540/YoPro-1) and mitochondrial membrane potential status (JC-1) were evaluated by flow cytometry. MLT treatment significantly enhanced the percentage of static spermatozoa after 7 days of storage and significantly reduced the percentage of progressively motile spermatozoa on Day 7. The velocity characteristics (VCL, VSL and VAP) were significantly higher for MLT-treated samples on Day 1 and were their lowest on Day 7. With regard to flow cytometry results, the percentage of viable spermatozoa with an intact acrosome was higher in MLT samples throughout the entire storage period. In addition, there was a significantly higher proportion of live spermatozoa on Day 7 in the samples that had not been treated with MLT. The proportion of spermatozoa showing a high mitochondrial membrane potential remained at similar levels ( $P > 0.05$ ) throughout the trial. Although the findings of the present study revealed that 1  $\mu$ M MLT increased the proportion of live sperm with an intact acrosome, this treatment did not enhance the spermatid quality of refrigerated boar semen.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Artificial insemination (AI) during pig production is widely applied throughout the developed world by the use of semen that is preserved in the liquid state, which is stored at 15–20 °C for several days until it is used for AI [1]. To preserve spermatozoa for prolonged periods,

their metabolic activity needs to be reduced by dilution into an appropriate medium and by lowering the temperature. Several commercial boar semen extenders, which have been proposed for long-term use (i.e., for use during 5 days of storage), are currently available [2]. However, the fertility outcome of liquid semen is gradually lost during extended storage periods and is significantly affected when the number of fertile sperm is below a certain threshold level [3]. Both functional and structural sperm attributes are susceptible to damage during storage. The most common of these attri-

\* Corresponding author. Tel.: +34-927257100 Ext: 1303; Fax: +34-927257110.

E-mail address: [crgil@unex.es](mailto:crgil@unex.es) (M.C. Gil).

butes that have been studied are plasma membrane- and acrosome- integrity as well as motility. The mechanisms underlying the reduction in fertility of preserved semen are not completely understood. During storage, boar spermatozoa undergo several changes, including diminished motility and viability and alterations in membrane permeability [4,5]. In addition, boar spermatozoa are susceptible to cold shock. This may be related to the lipid composition of the boar spermatozoan membrane, which contains a high concentration of polyunsaturated fatty acids [6–8]. It has been suggested that part of the reduction in sperm fertility may be due to oxidative damage from inappropriate formation of reactive oxygen- (ROS) or nitrogen- (RNS) species, which lead to subsequent membrane lipid peroxidation. In addition, this oxidative damage may be exacerbated by the relatively low antioxidant capacity of boar seminal plasma [6,9,10]. Although small fluctuations in the steady state concentration of ROS/RNS may play a role in intracellular signalling [11], uncontrolled increases in these metabolites can directly induce lipid peroxidation, irreversibly arrest sperm motility and damage protein and DNA, which may lead to apoptosis and cell death [12].

Supplementation of various antioxidants in the extender solution, such as crocin, Trolox, vitamin C, N-acetyl-cysteine, taurine, glutathione, raffinose, trehalose, cysteamine and butylated hydroxytoluene during liquid storage or cryopreservation of mammalian spermatozoa, has been reported to have beneficial effects [13–21]. In general, antioxidants prevent oxidation of biologically important molecules by free radicals or their reactive metabolites. They can reduce the impact of oxidative stress during the sperm storage process and improve the quality of liquid-stored boar semen [17].

Melatonin (MLT) is an endogenously produced indolamine, which is mainly synthesized in the pineal gland of all mammalian species. In addition, MLT regulates a diverse number of important physiological processes [22–24]. In 1993, MLT was demonstrated to function as a direct free radical scavenger when it was shown to detoxify the highly reactive hydroxyl radical (OH) *in vitro* [25]. Since then, a large number of publications have confirmed the ability of MLT and its metabolites to reduce oxidative stress *in vitro* [24]. The presence of MLT receptors has been reported in many areas of the brain, the pituitary gland and peripheral tissues such as the reproductive organs [26,27]. Several studies have even shown that MLT may have an effect on human and animal sperm [28–35]. Interestingly, human seminal fluid contains MLT [36] and spermato-

zoa possess membrane melatonin receptors [37]. However, the regulation of sperm function by MLT is not well understood. In fact, reports on its antioxidant activities in semen are rather contradictory.

Due to its antioxidant properties, MLT could be added to a semen extender in order to improve semen characteristics during long-term *in vitro* storage. However, the effect of MLT on long-term boar sperm storage has never been examined. The aim of this study was to investigate whether the supplementation of boar semen extender with MLT could improve the quality of liquid semen stored at 17 °C for 7 days.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals, sample collection and processing of ejaculates

A total of 33 fresh semen samples from 14 boars (Iberian and Duroc breeds, 2–4 years of age) housed at a commercial insemination station (Tecnogenex, S. L., Mérida, Spain) were used as ejaculate donors. The boars were housed in individual pens in an environmentally controlled (15–25 °C) building and received the same diet. Artificial insemination using preserved liquid semen from these boars demonstrated their fertility.

Sperm-rich fractions were collected with the gloved-hand technique and immediately placed in a water bath at 38 °C. After collection, a computer-aided sperm analysis system (CASA) (ISAS Psus®, Proiser R+D S.L., Paterna, Valencia) was used for evaluation of sperm characteristics (sperm concentration, motility and normal morphology). Only ejaculates with at least 70% motile spermatozoa, 80% morphologically normal spermatozoa and a total number of spermatozoa higher than  $10 \times 10^9$  were used. Immediately after collection, two sub-samples of each whole ejaculate were diluted in a commercial extender solution (Vitasem LD, Magapor, Zaragoza, Spain, pH 7.8, 290 mOsm/Kg) to a final concentration of  $35 \times 10^6$  cells/mL. A total of 1  $\mu$ M MLT (34 mM stock solution in ethanol) (Calbiochem®, La Jolla, CA, US) was added to one sub-sample (MLT-T = MLT-treated sample), while the other sub-sample remained as the untreated sample. The extended semen from each sub-sample was then stored in plastic bottles in a semen storage unit at 20–22 °C for approximately 60 min for transit to the laboratory. Once the semen reached 22–25 °C, doses were stored in a refrigerated incubator (FOC 225 I, VELP Scientifica, Usmate, Italy) at 17 °C for 7 d (Day of collection = Day 0). On

Days 1, 4 and 7, an aliquot of each sample was removed and analysed for sperm characteristics.

The MLT concentration (1  $\mu$ M) was carefully chosen based on the literature [30] and after performing an ethanol dose-response curve to select the concentration of ethanol that did not compromise sperm characteristics. Semen from up to four animals were pooled using doses from a minimum of eight boars in different combinations ( $n = 4$ ). From each pool plastic bottles were filled with 80 ml of seminal sample and 0.001%, 0.003%, 0.01%, 0.03%, 0.3% and 1% ethanol was added to each bottle. One sample remained as control. Then bottles were stored in a refrigerated incubator (FOC 225 I, VELP Scientifica, Usmate, Italy) at 17 °C for 24 hours. After this time, an aliquot of each sample was analysed for sperm characteristics as described below.

## 2.2. Sperm quality assessments

Sperm quality was determined by assessing sperm motility, viability, acrosomal status, plasma membrane fluidity and the mitochondrial membrane potential status of the spermatozoa. Motility analyses were performed by a CASA system, and the remaining parameters were assessed by flow cytometry.

### 2.2.1. Assessment of sperm motility

Immediately after gentle mixing, 1 mL of stored semen was taken from each bottle and examined for a motility pattern using a CASA system (ISAS®, Proiser R+D, Paterna, Valencia, Spain) following incubation at 38 °C for 30 min in a water bath. A total of 2  $\mu$ L of sample was placed in a prewarmed counting chamber (Leja®, Luzernestraat, The Netherlands). Sperm motility was assessed with a microscope equipped with a 10X negative-phase contrast objective and a heated stage at 38 °C. Analysis was based on the examination of 25 consecutive digitalised images obtained from several fields, and at least 300 spermatozoa per sample were analysed. After acquiring representative fields, the following sperm motility descriptors were recorded: total motile spermatozoa (% TMS), progressively motile spermatozoa (% PMS, STR > 80%), VCL (curvilinear velocity in  $\mu$ m/sec), VSL (straight-line velocity in  $\mu$ m/sec), VAP (average path velocity in  $\mu$ m/sec), LIN (linearity coefficient in %), STR (straightness coefficient in %) and ALH (amplitude of lateral head displacement in  $\mu$ m). Spermatozoa with an average path velocity (VAP) <10  $\mu$ m/sec were considered immotile, spermatozoa deviating <10% from a straight line were designated as linearly motile and spermatozoa

with a radius <25  $\mu$ m were classified as circularly motile [38].

### 2.2.2. Assessment of sperm viability

As described previously [39], fluorescent staining using the LIVE/DEAD Sperm Viability Kit (Leiden, The Netherlands) was used to assess porcine spermatozoa viability. Briefly, 5  $\mu$ L of SYBR-14 (2  $\mu$ mol/L) and 10  $\mu$ L of propidium iodide (PI, 5  $\mu$ mol/L) were added to 500  $\mu$ L of diluted semen sample (30  $\times$  10<sup>6</sup> cells/mL) in isotonic buffered diluent (Coulter Isoton II Diluent, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) and incubated 20 min at 38 °C. After incubation, cells were analysed, and the results were expressed as the percentage of SYBR-14-positive and propidium iodide-negative spermatozoa.

### 2.2.3. Assessment of acrosome integrity

The acrosomal status of spermatozoa was assessed after staining the sperm with peanut agglutinin conjugated with phycoerythrin (PNA-FITC, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) as a marker for acrosomal status and PI (component B of sperm viability kit) [5]. Aliquots of 100  $\mu$ L of each semen sample (30  $\times$  10<sup>6</sup> cells/mL) were incubated at room temperature in the dark for 5 min with 1  $\mu$ g/mL PNA-FITC and 6  $\mu$ mol/L PI. Just before analysis, 400  $\mu$ L of isotonic buffered diluent was added to each sample and remixed before flow cytometry analysis. After incubation, cells were analysed, and the results were expressed as the percentage of PNA-positive and propidium iodide-negative spermatozoa.

### 2.2.4. Assessment of plasma membrane fluidity

Plasma membrane fluidity was assessed after staining the sperm with merocyanine 540 (M-540, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) and YoPro-1 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) [40]. Aliquots of 100  $\mu$ L of each semen sample (30  $\times$  10<sup>6</sup> cells/ml) were diluted in 400  $\mu$ L of isotonic buffered diluent containing 75 nmol/L YoPro-1, which were then mixed and incubated at 38 °C for 15 min. Just before analysis, M-540 was added to each sample to a final concentration of 2  $\mu$ mol/L, incubated for 2 min and remixed before flow cytometry. After incubation, the cells were analysed and the results were expressed as the percentage of viable sperm with an unstable plasma membrane (YoPro-1-negative/M-540-positive).

### 2.2.5. Assessment of mitochondrial membrane potential status

The lipophilic cation JC-1 was used to assess the mitochondrial membrane potential status of spermatozoa. JC-1 reversibly changes its fluorescence from

green (monomeric status) to orange (multimeric status) when the mitochondrial membrane potential is high [41]. From each sperm sample, 100  $\mu\text{L}$  ( $30 \times 10^6$  cells/mL) were diluted in 400  $\mu\text{L}$  of isotonic buffered diluent containing 0.15 mmol/L JC-1 and then mixed and incubated at 38 °C for 30 min. The samples were remixed before flow cytometry analysis. The percentage of orange stained cells was recorded, these cells were considered the population of cells with a high mitochondrial membrane potential (hMMP).

#### 2.2.6. Flow cytometry analyses

Flow cytometry analyses were performed using a Coulter EPIC XL flow cytometer (Beckman Coulter Ltd.). The fluorophores were excited by a 200 mV argon ion laser operating at 488 nm. A total of 10 000 gated events (bases on the forward scatter and side scatter of the sperm population recorded in the linear mode) were collected per sample with sample running rates of approximately 500 events/sec. Fluorescence data were collected in the logarithmic mode. The fluorescence values of PNA-FITC, YoPro-1, SYBR-14 and JC-1 were collected in the FL1 sensor using a 525 nm band pass (BP) filter. PI fluorescence was collected in the FL3 sensor using a 620 nm BP filter, and M-540 and JC-1 fluorescence were collected in the FL2 sensor using a 575 nm BP filter. Flow cytometric data were analysed using a Facstation computer and EXPO™ 32 ADC software (Beckman Coulter, Inc.).

#### 2.2.7. Statistical analysis

A power analysis was conducted to determine appropriate animals and samples. To estimate the number of ejaculates from preliminary data, a 10 point maximum standard deviation for cytometric parameters was considered, and to obtain estimations with 3.5 points of error with a 95% confidence interval, a power analysis showed that we needed 33 ejaculates.

The mean and standard error of the mean were calculated for descriptive analysis, as well as the intra-class correlation coefficient to show the variability among boars and among ejaculates.

The effects of treatment (untreated and MLT-T) and storage time (1, 4 and 7 d) on several seminal characteristics (motility, viability, membrane fluidity and acrosomal and mitochondrial membrane status of spermatozoa) were analysed statistically. Q-Q plots were used to check for departures from normally distributed data. None of the four measures performed by flow cytometry satisfied the normality requirement in order to perform a parametric analysis of variance. When statistically significant differences were detected using

Table 1

Baseline measurements of seminal samples (day 0).

Parameter	Value
TMS (%)	90.0
PMS (%)	77.0
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	62.61 $\pm$ 0.49
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	49.84 $\pm$ 0.47
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	56.79 $\pm$ 0.46
LIN (%)	78.40 $\pm$ 0.00
STR (%)	85.81 $\pm$ 0.00
ALH ( $\mu\text{m}$ )	1.80 $\pm$ 0.01
SYBR-14/PI – (%)	94.50 $\pm$ 0.40
PNA+/PI – (%)	3.00 $\pm$ 0.90
VUM (%)	6.03 $\pm$ 1.65
hMMP (%)	87.95 $\pm$ 2.23

TMS indicates total motile sperm; PMS, progressively motile sperm. VCL, VSL, VAP, LIN, STR and ALH values are mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

SYBR-14 +/PI – indicates viable spermatozoa with an intact plasma membrane; PNA +/PI –, viable spermatozoa with a damaged acrosome; VUM, viable spermatozoa with an unstable plasma membrane; hMMP, percentage of spermatozoa with high mitochondrial membrane potential. These values are mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

this test, the non-parametric Mann-Whitney U-Test was used to compare pairs of values directly. For the analysis of the percentage of motile and progressive spermatozoa, we used the Pearson Chi-square test. The effect of treatment and storage time on the motility variables was assessed using a General Linear Model. Treatment and storage time were included as fixed effects. Boar was included as a random effect in these models. Pair wise comparison of significant fixed effects (main effect or interaction) was performed using a t-test. When results lacked normality and the validity of statistical estimates were in doubt, we used a non-parametric bootstrap technique to confirm these results.

A mixed-effects model (with boars and ejaculates within boars as random effects and treatment and storage time as fixed effects) was applied to experimental design, so the models for analysis had the expression:

“Motility Parameter  $\sim$  TREATMENT \* CONSERVATION + (1 BOAR/EJACULATE)”, where Motility Parameter is one of VCL, VSL, VAP, LIN, STR or ALH.

These models allow us to estimate for descriptive statistics the variability among boars, ejaculates within boars, and ejaculates, but especially the differences between treatments on days 1, 4 and 7 of storage.

All statistical analyses were performed using the statistical package SPSS version 15 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and the library Bootstrap R (S6 Plus) Functions R package version 1.2-42



Table 2

Effects of different ethanol concentrations on motility parameters after 24 hours of storage.

Ethanol concentration (%)	TMS (%)	PMS (%)	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	LIN (%)	STR (%)	ALH ( $\mu\text{m}$ )
Control (0%)	65.9 <sup>a</sup>	58.4 <sup>a</sup>	69.35 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup>	40.12 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>	54.21 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	59.59 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	74.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	2.42 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
0.001	63.8 <sup>a</sup>	54.1 <sup>a</sup>	68.78 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>	39.20 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	53.09 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>	59.18 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	73.88 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	2.47 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
0.003	64.7 <sup>a</sup>	58.2 <sup>a</sup>	69.49 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup>	41.10 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	54.64 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>	60.78 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	74.74 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	2.42 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
0.01	58.7 <sup>b</sup>	57.0 <sup>a</sup>	69.13 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup>	41.39 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	54.39 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>	61.76 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	75.95 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	2.42 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
0.03	55.8 <sup>b</sup>	58.6 <sup>a</sup>	71.17 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup>	43.28 $\pm$ 0.53 <sup>b</sup>	57.01 $\pm$ 0.54 <sup>b</sup>	62.64 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	75.88 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	2.43 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
0.3	52.5 <sup>b</sup>	59.4 <sup>a</sup>	68.16 $\pm$ 0.74 <sup>a</sup>	39.89 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>	53.27 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	60.62 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	74.92 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	2.42 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
1	33.1 <sup>b</sup>	58.2 <sup>a</sup>	66.46 $\pm$ 1.03 <sup>a</sup>	37.94 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup>	48.52 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>	58.59 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	76.96 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	2.56 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>

TMS indicates total motile sperm; PMS, progressively motile sperm VCL, VSL, VAP, LIN, STR and ALH values are mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

<sup>a,b</sup> Comparisons have been made with respect to control sample. For each concentration and parameter, values with different superscripts are statistically different ( $P < 0.05$ ).

from the statistical package R 2.6.11 [42]. Statistical significance was considered to be  $P < 0.05$ .

### 3. Results

Basal measurements (Day 0) of seminal samples are given in Table 1. With regard to the effects of different concentrations of ethanol on sperm characteristics, a significant decrease on total motile sperm percentage was observed at 0.01% ethanol concentration, therefore we decided to use the immediately lower concentration (0.003%) (Tables 2 and 3). Moreover, the possible effects of pH and osmolarity on seminal characteristics in MLT-T samples in comparison with untreated samples were discarded, as these values remained unchanged in both groups during the trial (data not shown).

#### 3.1. Motility characteristics

Table 4 shows the decomposition of observed variability in motility parameters. The effects of MLT on

spermatozoan motility characteristics over 7 days of storage are shown in Table 5. In both groups (untreated samples and MLT-T samples), the total motile sperm percentage (TMS) decreased from Day 1 to 7 but this drop became more pronounced with MLT treatment. The highest significant difference ( $P < 0.05$ ) in TMS percentage between these groups was seen on Day 7 (80.4%—untreated, 61.5%—MLT-T).

The behaviour of the progressively motile spermatozoa percentage (PMS) was similar between groups. There was a decrease in the untreated group from Days 1 to 4, which was not observed with MLT, and it increased in both groups on Day 7 of storage. The highest percentage of PMS spermatozoa was among spermatozoa from untreated doses on Days 1 and 7 of storage.

In Figure 1 (a–f), we can see the behaviour of each of the six motility parameters (from untreated and MLT-T groups) throughout the entire storage period. In addition, these figures allow an evaluation of the interaction between treatment (untreated and MLT-T) and

Table 3

Effects of different ethanol concentrations on seminal characteristics by flow cytometry after 24 hours of storage.

Ethanol concentration (%)	SYBR-14+/PI–	PNA+/PI–	VUM	hMMP
Control (0%)	92.5 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>	2.32 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	6.60 $\pm$ 0.84 <sup>a</sup>	90.85 $\pm$ 2.42 <sup>a</sup>
0.001	92.42 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	2.35 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	6.55 $\pm$ 1.10 <sup>a</sup>	87.42 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>
0.003	92.75 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	2.00 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	6.70 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>	87.57 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>
0.01	92.87 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	2.35 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	6.90 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	88.15 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>
0.03	92.82 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	2.15 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	6.50 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	87.92 $\pm$ 0.80 <sup>a</sup>
0.3	91.67 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	2.05 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	7.60 $\pm$ 0.84 <sup>a</sup>	86.67 $\pm$ 0.92 <sup>a</sup>
1	88.62 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup>	2.02 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	8.65 $\pm$ 1.20 <sup>a</sup>	83.00 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>

Values are percentages (mean  $\pm$  standard error of the mean, SEM).

SYBR-14 +/PI – indicates viable spermatozoa with an intact plasma membrane; PNA +/PI –, viable spermatozoa with a damaged acrosome; VUM, viable spermatozoa with an unstable plasma membrane; hMMP, percentage of spermatozoa with high mitochondrial membrane potential.

<sup>a,b</sup> Comparisons have been made with respect to control sample. For each concentration and parameter, values with different superscripts are statistically different ( $P < 0.05$ ).

Table 4  
Decomposition of observed variability in motility parameters.

Parameter	SD (ICC) boars	SD (ICC) ejaculates	SD spermatozoa
VCL	11.50 (16.3%)	6.52 (6.2%)	25.28
VSL	4.50 (5.6%)	3.30 (3.2%)	18.15
VAP	9.10 (17%)	5.88 (8.5%)	19.25
LIN	0.06 (6.4%)	0.03 (1.8%)	0.24
STR	0.06 (6.4%)	0.05 (4.8%)	0.23
ALH	0.25 (6.7%)	0.24 (6.6%)	0.91

ICC, intraclass correlation coefficient; SD, standard deviation.

storage time (1, 4 and 7 d). The results of the analysis of variance (ANOVA) for motility parameters are shown in Table 6. With regard to velocity characteristics (VCL, VSL and VAP), no significant effect ( $P > 0.05$ ) was seen with treatment. In other words, these values decreased throughout the storage time in both groups. It is noteworthy that on Day 1, these values were highest for samples treated with MLT. In contrast, they were the lowest on Day 7 in the MLT-T samples and were significantly different ( $P < 0.05$ ) than the untreated samples. The highest differences were observed on Day 7 of storage.

The behaviour of the LIN parameter was completely different with respect to the preceding characteristics. There was a significant effect of treatment ( $P < 0.05$ ) on LIN, which showed higher values for untreated samples throughout the entire storage period. There

was also an interaction between treatment and storage time variables such that, although in the untreated samples this parameter increased from Days 4 to 7, in the MLT-T samples LIN remained unchanged for the same period. The highest difference between groups was seen on Day 7.

With regard to STR, the highest significant difference between treatments was seen on Day 1 with a higher value for untreated samples.

Neither treatment effect nor interaction affected the ALH parameter. The highest values were found among sperm from MLT-T doses on Days 1 and 4 with no significant differences between treatments on Day 7 of storage ( $P > 0.05$ ).

### 3.2. Flow cytometry results

The effects of 1- $\mu$ M MLT on seminal parameters assessed by flow cytometry are presented in Table 7. The proportion of viable spermatozoa with an intact plasma membrane (as assessed by SYBR-14/PI) remained unchanged throughout the entire period of storage in untreated samples. The percentage of viable spermatozoa with a damaged acrosome was also unchanged for both groups (untreated and MLT-T).

With MLT treatment, the viable sperm percentage with an intact plasma membrane was only significantly different ( $P < 0.05$ ) after 7 days of storage. The same result was obtained for the percentage of spermatozoa

Table 5  
Effects of 1  $\mu$ M melatonin on motility parameters.

Parameter	Treatment	Day 1	Day 4	Day 7
TMS (%)	UT	89.9 <sup>*a</sup>	85.1 <sup>*b</sup>	80.4 <sup>*c</sup>
	MLT-T	88.1 <sup>**a</sup>	77.1 <sup>**b</sup>	61.5 <sup>**c</sup>
PMS (%)	UT	47.3 <sup>*a</sup>	42.1 <sup>*b</sup>	52.7 <sup>*c</sup>
	MLT-T	44.0 <sup>**a</sup>	44.0 <sup>**a</sup>	48.9 <sup>**b</sup>
VCL ( $\mu$ m/s)	UT	53.42 $\pm$ 0.28 <sup>*a</sup>	52.96 $\pm$ 0.26 <sup>*a</sup>	47.98 $\pm$ 0.31 <sup>*b</sup>
	MLT-T	57.36 $\pm$ 0.27 <sup>**a</sup>	53.01 $\pm$ 0.32 <sup>*b</sup>	42.36 $\pm$ 0.49 <sup>**c</sup>
VSL ( $\mu$ m/s)	UT	33.38 $\pm$ 0.20 <sup>*a</sup>	29.83 $\pm$ 0.19 <sup>*b</sup>	27.95 $\pm$ 0.22 <sup>*c</sup>
	MLT-T	34.76 $\pm$ 0.19 <sup>**a</sup>	29.20 $\pm$ 0.23 <sup>*b</sup>	23.19 $\pm$ 0.35 <sup>**c</sup>
VAP ( $\mu$ m/s)	UT	45.65 $\pm$ 0.21 <sup>*a</sup>	43.37 $\pm$ 0.20 <sup>*b</sup>	38.69 $\pm$ 0.24 <sup>*c</sup>
	MLT-T	49.16 $\pm$ 0.20 <sup>**a</sup>	41.74 $\pm$ 0.24 <sup>**b</sup>	31.54 $\pm$ 0.37 <sup>**c</sup>
LIN (%)	UT	63.70 $\pm$ 0.00 <sup>*a</sup>	60.20 $\pm$ 0.00 <sup>*b</sup>	63.20 $\pm$ 0.00 <sup>*a</sup>
	MLT-T	62.60 $\pm$ 0.00 <sup>**a</sup>	58.20 $\pm$ 0.00 <sup>**b</sup>	58.10 $\pm$ 0.00 <sup>**b</sup>
STR (%)	UT	73.70 $\pm$ 0.00 <sup>*a</sup>	70.70 $\pm$ 0.00 <sup>*b</sup>	74.60 $\pm$ 0.00 <sup>*a</sup>
	MLT-T	71.60 $\pm$ 0.00 <sup>**a</sup>	71.40 $\pm$ 0.00 <sup>*a</sup>	74.30 $\pm$ 0.00 <sup>*b</sup>
ALH ( $\mu$ m)	UT	1.77 $\pm$ 0.01 <sup>*a</sup>	1.85 $\pm$ 0.01 <sup>*b</sup>	1.76 $\pm$ 0.01 <sup>*a</sup>
	MLT-T	1.87 $\pm$ 0.01 <sup>**a</sup>	1.91 $\pm$ 0.01 <sup>**b</sup>	1.74 $\pm$ 0.01 <sup>*c</sup>

UT, untreated samples; MLT-T, treatment with 1  $\mu$ M Melatonin.

TMS indicates total motile sperm; PMS, progressively motile sperm; TSM and PM values are percentages; VCL, VSL, VAP, LIN, STR and ALH values are estimated marginal means  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

\*,\*\* For each parameter and within each storage day (columns) values with different superscripts are statistically different ( $P < 0.05$ ).

a,b,c For each parameter and treatment (NA or MLT) (rows) values with different superscripts are statistically different ( $P < 0.05$ ).

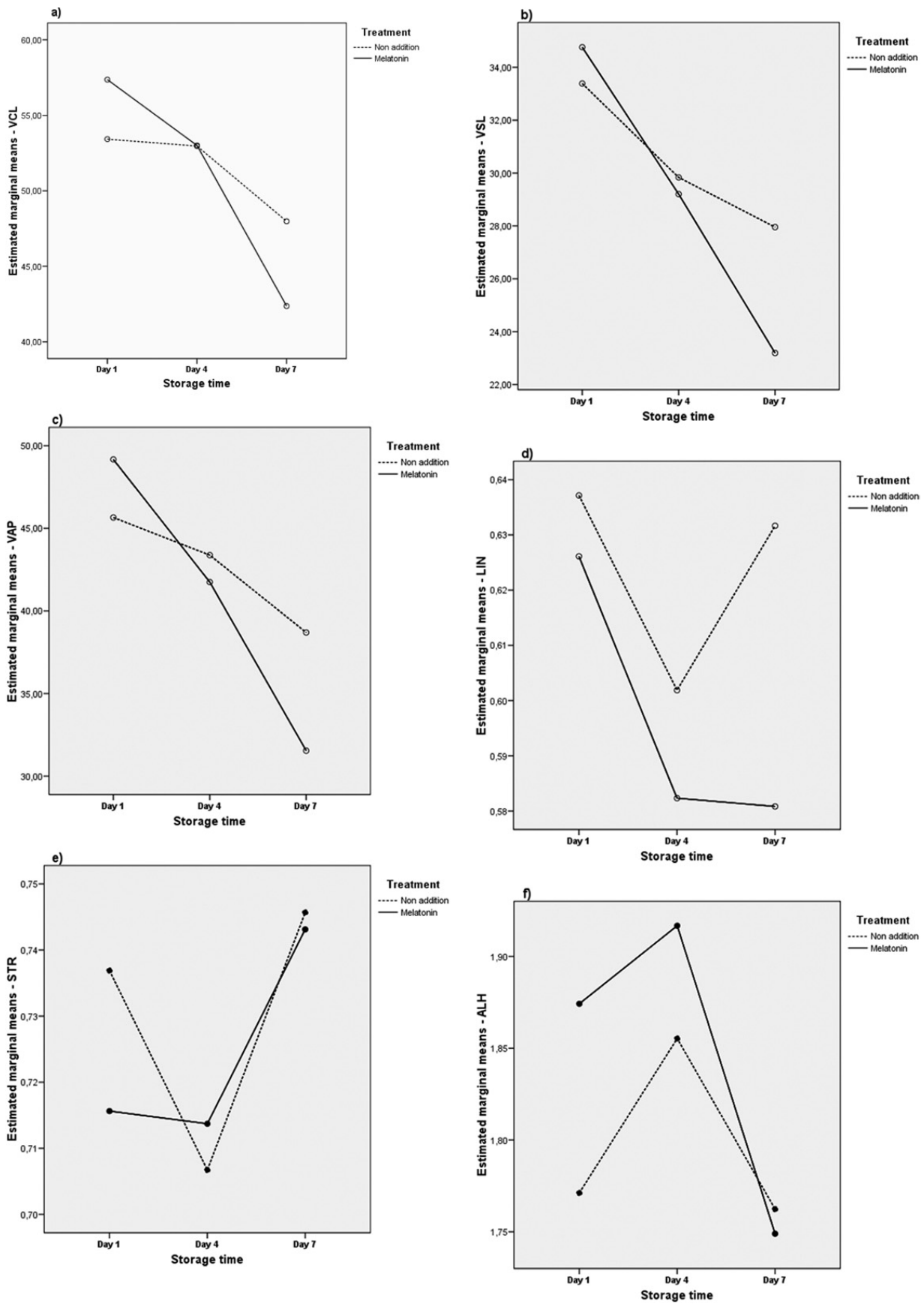


Figure 1. (a–f). Effects of storage time, melatonin addition and interaction (treatment x day) on motility parameters (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH). Graphic express the estimated marginal means for each one of the six velocity parameters.

Table 6

Results (P-values) of the analysis of variance (ANOVA) for sperm motility parameters. Treatment, day of storage and interaction (treatment  $\times$  day) were included as factors of variation.

Factor	Treatment	Day	Treatment $\times$ Day
VCL	NS	P < 0.001	0.028
VSL	NS	P < 0.001	NS
VAP	NS	P < 0.001	0.012
LIN	0.028	NS	0.038
STR	NS	NS	0.039
ALH	NS	NS	NS

Significance, P < 0.05; NS, not significant.

with hMMP and viable spermatozoa showing high merocyanine fluorescence (unstable plasma membrane) in both untreated and MLT-treated samples.

When comparisons were made between treatments, only the proportion of spermatozoa showing hMMP was kept at a similar level (P > 0.05) during the trial.

Only the percentage of viable spermatozoa showing a damaged acrosome was significantly different between the MLT-T- and untreated- samples on Days 1, 4 and 7 of storage with the best results for MLT-T samples. For the rest of the parameters, and on each day of the trial, the best results were obtained from untreated samples.

The result with the highest significant difference between treatments was the percentage of viable spermatozoa showing an intact plasma membrane at Day 7. The lowest values for this data set were recorded for the MLT-T samples (86.09%  $\pm$  1.33 MLT-T doses versus 92.04%  $\pm$  0.33 untreated doses).

#### 4. Discussion

The *in vitro* effects of MLT on sperm function and its ability to scavenge NO and ROS have been studied by several investigators [16,29–31,36]. However, the role of MLT in sperm function has not been clearly elucidated, and its antioxidant or protective activities in semen are rather contradictory. Most of these previous studies have tested MLT's antioxidant ability by imposing a treatment that markedly elevates oxidative stress or after incubation for several hours at 37 °C but not during long-term semen storage. In the present study, we observed a clear negative effect of MLT on boar semen, which was characterised by an increase in the percentage of static spermatozoa after 7 days of storage. In MLT-T samples, the motile spermatozoa percentage decreased nearly 19% on Day 7.

Gwayi and Bernard [32] have attributed some of the negative effects of MLT on rat sperm motility to the high ethanol concentration (0.5% final concentration) needed for solubility. In our study we observed that ethanol concentration lower than 0.01% had no effect on the sperm parameters examined.

Treatment of human sperm with 150–450 pg/ml MLT has been reported to have an inhibitory effect on motility *in vitro* [33]. For example, at a concentration of 20 mM, MLT inhibited human spermatozoa movement in the channels of an incubation chamber (i.e., it showed a chemorepellent effect) [43]. Gwayi and Bernard [32] observed that MLT had dose-dependent negative effects on the sperm motility index in Wistar rats. In addition, incubation of bull semen with MLT at doses between 0.5–4 mM for 60 min caused a significant decrease in spermatozoa motility [44]. On the

Table 7

Results of the evaluation of seminal characteristics by flow cytometry.

Parameter	Treatment	Day 1	Day 4	Day 7
SYBR-14 +/PI –	UT	92.54 $\pm$ 0.47 <sup>*a</sup>	92.40 $\pm$ 0.40 <sup>*a</sup>	92.04 $\pm$ 0.33 <sup>*a</sup>
	MLT-T	91.60 $\pm$ 0.33 <sup>*a</sup>	90.49 $\pm$ 0.44 <sup>**a</sup>	86.09 $\pm$ 1.33 <sup>**b</sup>
PNA +/PI –	UT	5.09 $\pm$ 0.49 <sup>*a</sup>	4.95 $\pm$ 0.41 <sup>*a</sup>	6.39 $\pm$ 0.52 <sup>*a</sup>
	MLT-T	3.65 $\pm$ 0.38 <sup>**a</sup>	3.71 $\pm$ 0.34 <sup>**a</sup>	4.26 $\pm$ 0.45 <sup>**a</sup>
VUM	UT	6.68 $\pm$ 0.46 <sup>*a</sup>	6.93 $\pm$ 0.41 <sup>*a</sup>	12.27 $\pm$ 2.36 <sup>*b</sup>
	MLT-T	9.63 $\pm$ 0.70 <sup>**a</sup>	11.28 $\pm$ 1.00 <sup>**a</sup>	17.17 $\pm$ 3.07 <sup>*b</sup>
hMMP	UT	78.25 $\pm$ 3.25 <sup>*a</sup>	71.26 $\pm$ 5.21 <sup>*a</sup>	62.48 $\pm$ 4.24 <sup>*b</sup>
	MLT-T	76.71 $\pm$ 4.00 <sup>*a</sup>	69.24 $\pm$ 5.34 <sup>*a<sup>b</sup></sup>	62.79 $\pm$ 4.62 <sup>*b</sup>

UT, untreated samples; MLT-T, treatment with 1  $\mu$ M Melatonin.

Values are percentages (mean  $\pm$  standard error of the mean, SEM).

SYBR-14 +/PI – indicates viable spermatozoa with an intact plasma membrane; PNA +/PI –, viable spermatozoa with a damaged acrosome; VUM, viable spermatozoa with an unstable plasma membrane; hMMP, percentage of spermatozoa with high mitochondrial membrane potential.

\*,\*\* For each parameter and within each storage day (columns) values with different superscripts are statistically different (P < 0.05).

a,b,c For each parameter and treatment (NA or MLT) (rows) values with different superscripts are statistically different (P < 0.05).

contrary, Jang et al. [34] treated boar sperm with 100 nM MLT in the presence or absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 12 h at 37 °C and then examined sperm characteristics. They observed that motility in the MLT-T group was significantly higher than in the untreated group. Similarly, the addition of 2 mM MLT to human semen significantly increased the percentage of motile cells, as well as the percentage of progressive motility and rapidly moving cells after, 120 min of incubation at 37 °C [29]. However, in the absence of exogenous oxidative stress, addition of MLT (0.1 mM final concentration for 4 h at 37 °C) to thawed spermatozoa from red deer had no effect on motility characteristics. For oxidised samples only, 5 mM MLT enhanced total motility [16].

Our study results were different from those observed by du Plessis et al. [29], whereby MLT produced a drop in the percentage of progressively motile sperm (especially on Days 1 and 7).

The effect of MLT on motility parameters evaluated by the CASA system has hardly been investigated. It was noteworthy in our study that there was an increase in three velocity indicators (VCL, VSL and VAP) only on Day 1 for spermatozoa treated with MLT. The lowest values were observed for MLT treatment on Day 7. In treated samples, LIN was also lower than non-treated samples, whereas ALH was significantly higher in MLT-T samples on Days 1 and 4. If we consider all of these motility parameters together, we can hypothesise that spermatozoa treated with MLT have a tendency to adopt a hyperactivated status. Hyperactivated spermatozoa have been shown to exhibit vigorous and non-linear movements caused by an increased amplitude of flagellar beats [45]. This hypothesis is consistent with the study of Fujinoki et al. [30], which demonstrated that concentrations of 1 pM to 1 μM MLT in capacitating medium enhanced hamster sperm hyperactivation during incubation at 37 °C for 4 h. In the present study, the observed increase in VCL, VSL and VAP on Day 1 for spermatozoa treated with MLT could be due to an immediate effect of MLT through its specific receptor. On the other hand, the short-term effect on motility characteristics on Day 1 could be followed by a long-term effect mediated by ROS/RNS depletion. Excessive amount of ROS can damage DNA, inhibit sperm-oocyte fusion, and reduce sperm motility [6]. It is possible that the MLT dose used in our study could deplete all ROS/NOS at the end of the trial and thereby have a negative effect on the functional parameters of spermatozoa.

Regarding the flow cytometry results described in the present study, the percentage of spermatozoa with

hMMP was not different between treatment groups. The percentage of viable spermatozoa with an intact plasma membrane was the greatest significant difference between groups on Day 7 (non-significant difference on Day 1). In addition, there was a similar behaviour at that time for the TMS percentage and motility results. Notably, the percentage of viable spermatozoa with an intact plasma membrane considerably dropped for spermatozoa from MLT-T samples. Interestingly, the progressive decrease in the percentage of motile and viable sperm was not associated with a decrease in mitochondrial membrane potential. MLT is a highly lipophilic molecule that crosses cell membranes to easily reach subcellular compartments. MLT appears to accumulate at high concentrations in mitochondria where it interacts with enzyme complexes I and IV [12]. The consequence of MLT's actions on mitochondria is an increase in ATP production [46]. One possibility is that the increase that we observed in sperm velocity on Day 1 could have been due to an increase in ATP production caused by MLT. Moreover, MLT interacts with lipid bilayers and stabilizes mitochondrial inner membranes, an effect that may improve the electron transport chain activity and thus increasing motility [12]. However, the stimulatory effects of MLT on motility during Day 1 and the fast decrease that was observed on Day 7 point to a mitochondrial-independent mechanism. Furthermore, Domínguez-Rebolledo et al. [16] did not observe an increase in mitochondrial membrane potential in thawed red deer sperm incubated for 4 h at 37 °C. In contrast, opposite results were found by Jang et al. [34] after boar semen was incubated at 37 °C for 12 h. On the other hand, the further decrease in sperm motility by MLT may be explained by its role as a cytoskeletal modulator. MLT is capable of influencing microfilament and microtubule organisation [47]. *In vitro* studies have shown that MLT plays a key role in cytoskeletal rearrangements through its antagonism of calmodulin. In addition, the effects on microtubule assembly appear to be dependent on hormone concentration. At a high concentration, non-specific binding of MLT to tubulin has been shown to occur, thereby overcoming MLT's antagonism to calmodulin [47–49]. Thus, in our study, the negative effect on motility could have been due to the high concentration of MLT.

Long-term storage increases the proportion of prematurely capacitated and acrosome reacted sperm [4,8,50]. In this study, MLT was not capable of reducing the percentage of viable sperm with an unstable plasma membrane but significantly increased the pro-

portion of live sperm with an intact acrosome. In the study by Domínguez-Rebolledo et al. [16], the proportion of spermatozoa with intact acrosomes within the viable population underwent little change during the incubation with melatonin of thawed spermatozoa from red deer. The effect of antioxidants, among other things, depends on the concentration reached at intracellular levels [24]. MLT is both lipophilic and hydrophilic, but little is known of its subcellular distribution. Perhaps the concentration specific to the acrosome was enough to protect it from an acrosomal reaction, but the intracellular concentration was not enough to decrease the percentage of viable sperm with an unstable plasma membrane.

In conclusion, these results suggest that in our experimental conditions, except for the proportion of live sperm with an intact acrosome, 1  $\mu$ M MLT was not able to improve the function of boar semen stored at 17 °C for 7 days.

## Acknowledgments

This work was supported by grant number PRI09A077 from Junta de Extremadura and AGL 2010-15188 from the Ministry of Education. David Martín Hidalgo was supported by a grant from Junta de Extremadura, Spain.

## References

- [1] Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 2000;62:143–72.
- [2] Gadea J. Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Span J Agric Res* 2003;1:17–27.
- [3] Haugan T, Reksen O, Grohn YT, Gaustad AH, Hofmo PO. A retrospective study on effects of storage time of liquid boar semen on reproductive performance in norwegian swine. *Theriogenology* 2005;64:891–901.
- [4] Conejo-Nava J, Fierro R, Gutierrez CG, Betancourt M. Membrane status and in vitro capacitation of porcine sperm preserved in long-term extender at 16 degrees. *C Arch Androl* 2003;49:287–95.
- [5] Waterhouse KE, De Angelis PM, Haugan T, Paulenz H, Hofmo PO, Farstad W. Effects of in vitro storage time and semen-extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry. *Theriogenology* 2004;62:1638–51.
- [6] Awda BJ, Mackenzie-Bell M, Buhr MM. Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biol Reprod* 2009;81:553–61.
- [7] Kadirvel G, Kumar S, Kumaresan A. Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. *Anim Reprod Sci* 2009;114:125–34.
- [8] Kumaresan A, Kadirvel G, Bujarbaruah KM, Bardoloi RK, Das A, Kumar S, Naskar S. Preservation of boar semen at 18 degrees C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2009;110:162–71.
- [9] Cerolini S, Maldjian A, Surai P, Noble R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim Reprod Sci* 2000;58:99–111.
- [10] Guthrie HD, Welch GR, Long JA. Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility. *Theriogenology* 2008;70:1209–15.
- [11] Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82:47–95.
- [12] Leon J, Acuna-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci* 2004;75:765–90.
- [13] Branco CS, Garcez ME, Pasqualotto FF, Erdtman B, Salvador M. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology* 2010;60:235–7.
- [14] Brezezinska-Slebodzinska E, Slebodzinski AB, Pietras B, Wieczorek G. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biol Trace Elem Res* 1995;47:69–74.
- [15] Coyan K, Baspinar N, Bucak MN, Akalin PP, Ataman MB, Omur AD, Gungor S, Kucukgunay S, Ozkalp B, Sariozkan S. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. *Res Vet Sci* 2010. doi:10.1016/j.rvsc.2010.03.025.
- [16] Dominguez-Rebolledo AE, Fernandez-Santos MR, Bisbal A, Ros-Santaella JL, Ramon M, Carmona M, Martinez-Pastor F, Garde JJ. Improving the effect of incubation and oxidative stress on thawed spermatozoa from red deer by using different antioxidant treatments. *Reprod Fertil Dev* 2010;22:856–70.
- [17] Funahashi H, Sano T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C. *Theriogenology* 2005;63:1605–16.
- [18] Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratsis P, Ververidis HN, Boscicos CM. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2009;112:119–35.
- [19] Neagu VR, Garcia BM, Sandoval CS, Rodriguez AM, Ferrusola CO, Fernandez LG, Tapia JA, Pena FJ. Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated hydroxytoluene improves postthaw sperm membrane integrity. *Theriogenology* 2010;73:645–50.
- [20] Shiva Shankar Reddy N, Jagan Mohanarao G, Atreja SK. Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation. *Anim Reprod Sci* 2010;119:183–90.
- [21] Tuncer PB, Bucak MN, Sariozkan S, Sakin F, Yeni D, Cigerci IH, Atessahin A, Avdatek F, Gundogan M, Buyukleblebici O. The effect of raffinose and methionine on frozen/thawed angora buck (*capra hircus ancyrensis*) semen quality, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities. *Cryobiology* 2010. doi:10.1016/j.cryobiol.2010.05.005.
- [22] Haldar C, Ahmad R. Photoimmunomodulation and melatonin. *J Photochem Photobiol B* 2010;98:107–17.
- [23] Korkmaz A, Topal T, Tan DX, Reiter RJ. Role of melatonin in metabolic regulation. *Rev Endocr Metab Disord* 2009;10:261–70.
- [24] Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Paredes SD, Mayo JC, Sainz RM. Melatonin and reproduction revisited. *Biol Reprod* 2009;81:445–56.
- [25] Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J* 1993;1:57–60.

- [26] Dubocovich ML. Pharmacology and function of melatonin receptors. *FASEB J* 1988;2:2765–73.
- [27] Zisapel N. Melatonin receptors revisited. *J Neural Transm* 1988; 73:1–5.
- [28] Bornman MS, Oosthuizen JM, Barnard HC, Schulenburg GW, Boomker D, Reif S. Melatonin and sperm motility. *Andrologia* 1989;21:483–5.
- [29] du Plessis SS, Hageenaar K, Lampiao F. The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. *Andrologia* 2010;42:112–16.
- [30] Fujinoki M. Melatonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. *Reproduction* 2008;136:533–41.
- [31] Gavella M, Lipovac V. Antioxidative effect of melatonin on human spermatozoa. *Arch Androl* 2000;44:23–7.
- [32] Gwayi N, Bernard RT. The effects of melatonin on sperm motility in vitro in wistar rats. *Andrologia* 2002;34:391–96.
- [33] Irez TO, Senol H, Alagoz M, Basmaciogullari C, Turan F, Kuru D, Ertungealp E. Effects of indoleamines on sperm motility in vitro. *Hum Reprod* 1992;7:987–90.
- [34] Jang H, Kim Y, Kim B, Park I, Cheong H, Kim J, Park C, Kong H, Lee H, Yang B. Ameliorative effects of melatonin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. *Reprod Domest Anim* 2009. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2009.01466.x
- [35] Luboshitzky R, Shen-Orr Z, Nave R, Lavi S, Lavie P. Melatonin administration alters semen quality in healthy men. *J Androl* 2002;23:572–8.
- [36] Luboshitzky R, Shen-Orr Z, Herer P. Seminal plasma melatonin and gonadal steroids concentrations in normal men. *Arch Androl* 2002;48:225–32.
- [37] van Vuuren RJ, Pitout MJ, van Aswegen CH, Theron JJ. Putative melatonin receptor in human spermatozoa. *Clin Biochem* 1992;25:125–7.
- [38] Saravia F, Wallgren M, Nagy S, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: Effects on sperm viability. *Theriogenology* 2005;63:1320–33.
- [39] Aparicio IM, Bragado MJ, Gil MC, Garcia-Herreros M, Gonzalez-Fernandez L, Tapia JA, Garcia-Marin LJ. Phosphatidylinositol 3-kinase pathway regulates sperm viability but not capacitation on boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 2007;74: 1035–42.
- [40] Harrison RA, Ashworth PJ, Miller NG. Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol Reprod Dev* 1996;45:378–91.
- [41] Amaral A, Ramalho-Santos J. Assessment of mitochondrial potential: Implications for the correct monitoring of human sperm function. *Int J Androl* 2010;33:180–6.
- [42] R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. Vienna, Austria, 2010.
- [43] Sliwa L, Stochmal E. The effect of melatonin on directional motility of human sperm under in vitro conditions. *Folia Med Cracov* 2001;42:123–8.
- [44] Tanyildizi S, Bozkurt T, Çiftçi O, Sakin F. *In vitro* effects of melatonin on hyaluronidase activity and sperm motility in bull semen. *Turk J Vet Anim Sci* 2006;30:89–93.
- [45] Schmidt H, Kamp G. Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction* 2004;128:171–9.
- [46] Martin M, Macias M, Leon J, Escames G, Khaldy H, Acuna-Castroviejo D. Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:348–57.
- [47] Benitez-King G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: Implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res* 2006;40: 1–9.
- [48] Benitez-King G, Anton-Tay F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* 1993;49:635–41.
- [49] Huerto-Delgado L, Anton-Tay F, Benitez-King G. Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: Role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J Pineal Res* 1994;17:55–62.
- [50] Huo LJ, Ma XH, Yang ZM. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology* 2002;58:1349–60.

**Anexo-3**

---





## The Effect of Resveratrol on the Quality of Extended Boar Semen During Storage at 17°C

David Martin-Hidalgo<sup>1</sup>, Ana Hurtado de Llera<sup>1</sup>, Heiko Henning<sup>2</sup>, Ulrike Wallner<sup>2</sup>, Dagmar Waberski<sup>2</sup>,  
Maria J. Bragado<sup>1</sup>, Maria C. Gil<sup>1\*</sup> & Luis J. Garcia-Marin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Research Group of Intracellular Signalling and Technology of Reproduction (SINTREP), Veterinary School, University of Extremadura, 10003 Caceres, Spain

<sup>2</sup> Unit for Reproductive Medicine of Clinics, Clinic for Pigs and Small Ruminants, University of Veterinary Medicine, Foundation, Hannover, Germany

Correspondence: Luis J. Garcia-Marin, Research Group of Intracellular Signalling and Technology of Reproduction (SINTREP), Veterinary School, University of Extremadura, 10003 Caceres, Spain. Tel: 34-927-257-100 ext. 51327. E-mail: ljgarcia@unex.es

\*Both authors contributed equally as senior investigators of this study.

Received: May 29, 2013 Accepted: June 20, 2013 Online Published: July 15, 2013

doi:10.5539/jas.v5n8p231

URL: <http://dx.doi.org/10.5539/jas.v5n8p231>

### Abstract

The natural polyphenol resveratrol may be beneficial to many aspects of cell function and animal health, although its actions in the male reproductive system vary depending on animal species. This work investigates resveratrol effects on the quality of preserved boar semen during liquid storage at 17°C. We used three approaches: 1) evaluation of conventional parameters of seminal quality, 2) measurement of specific response to capacitating stimuli, and 3) evaluation of mitochondria membrane potential and ATP content. Resveratrol supplementation causes i) a loss in the response of liquid stored boar spermatozoa to capacitating stimuli, ii) a decrease in the sperm ATP content and iii) a reduction in the mitochondrial membrane potential. Moreover, higher concentrations of resveratrol increase plasma membrane phospholipid disorder and reduce the percentage of motile spermatozoa. These results suggest that semen doses supplemented with resveratrol could be considered sub-fertile compared with semen stored hypothermally in standard conditions.

**Keywords:** resveratrol, boar semen storage, calcium influx, ATP

### 1. Introduction

Nowadays in the worldwide pig production, artificial insemination (AI) is made with semen that has been extended in the liquid state and stored at 15-20°C for 1 to 5 days (Johnson et al., 2000). AI allows a better distribution of genetic material of high quality and minimizes boar transportation. To preserve spermatozoa for prolonged periods, their metabolic activity needs to be reduced and this is approached by semen dilution into an appropriate medium and by lowering the temperature. Several commercial boar extenders have been proposed with this objective (Gadea, 2003), although the most widely used extender is the Beltsville-Thawing Solution (BTS) developed by Pursel and Johnson (1975) for thawing boar spermatozoa frozen in the pellet form, and later adapted for liquid storage (Pursel et al., 1978). Sperm membrane is rich in polyunsaturated fatty acid, which makes them very susceptible to oxygen-induced damage mediated by lipid peroxidation (LPO), especially in boar spermatozoa, which contains a high concentration of polyunsaturated fatty acids (Awda et al., 2009; Waterhouse et al., 2004). Several antioxidants have been used successfully in the supplementation of boars extenders: superoxide dismutase and catalase (Roca et al., 2005),  $\alpha$ -tocopherol (Cerolini et al., 2000) and L-Glutamine (Funahashi & Sano, 2005).

Resveratrol (RSV) is a natural grape-derived polyphenolic phytoalexin that possesses pleiotropic effects including anticancer, anti-aging, anti-inflammatory and anti-oxidant actions, as well as cardioprotection and neuroprotection (Fulda et al., 2010; Pervaiz & Holme, 2009). RSV effectively scavenges superoxide and peroxynitrite radicals generated from enzymatic and non-enzymatic systems, and afford protection against DNA damage caused by reactive oxygen species (ROS) in somatic cells (K. W. Lee & H. J. Lee, 2006).

Effects of resveratrol in spermatozoa have been studied in recent works. Thus, RSV addition (0.1, 1.0 and 10.0 mM) to cryopreservation medium of human spermatozoa is able to prevent cryopreservation-induced lipid

damage (Garcez et al., 2010) and at 10 mM also the cryopreservation-induced DNA damage (Branco et al., 2010). Although in both studies RSV treatment is not able to prevent the observed reduction in sperm motility after thawing, they conclude that this polyphenol might be used for the process of cryopreservation of human spermatozoa, at least for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) where motile spermatozoa are not needed to achieve fertilization.

In a different specie, ram, the use of RSV in the cryopreservation medium causes a decrease in the mitochondrial membrane potential without any effects in spermatozoa motility, or the integrity of acrosome or plasma membrane (Silva et al., 2012).

Collodel et al. (2011) describe that 100  $\mu\text{M}$  resveratrol treatment leads to a loss in viability in human spermatozoa as well as in rat spermatocytes, although at 15  $\mu\text{M}$  has a protector effect against ROS.

Resveratrol has been also studied as an antioxidant added to the diet of rats (Juan et al., 2005), where results are beneficial. The lower diameter of seminiferous tubules together with an increase in the density of testicular tubules produces an increase in the spermatogenic tissue would explain the increase in the spermatozoa concentration observed in rats supplemented with 20 mg/Kg resveratrol in their diets.

A recent investigation showed that intraperitoneal administration of resveratrol to rats prevents the loss of sperm motility, leads to a decrease in lipid peroxidation and prevents against oxidative stress occurring in rats with hyperthyroidism (Ourique et al., 2013).

Based on the beneficial effects of RSV in different species, the objective of the present work is to study the use of resveratrol to improve the storage of boar seminal doses at 17°C. Therefore, we have used different experimental approaches: 1) Evaluation of conventional sperm parameters to evaluate quality of seminal doses; 2) Evaluation of calcium influx and the specific sperm response to bicarbonate as proposed by Harrison et al. (1993), and 3) Analysis of resveratrol effects on sperm mitochondria membrane potential and ATP concentration.

## 2. Materials and Methods:

### 2.1 General Experiments Design

#### 2.1.1 Experimental Design 1

A total of 12 ejaculates (6 males, 2 ejaculates each) were diluted in BTS at final concentration of  $35 \times 10^6$  spermatozoa/mL and subsequently analyzed (day 0). Semen samples were treated without or with different concentrations of resveratrol: 10, 33, 66 and 100  $\mu\text{M}$  or DMSO (0.14 %) and preserved at 17°C for several days. Motility parameters as well as flow cytometry analyzed parameters (sperm viability, plasma membrane phospholipid disorder, acrosome membrane integrity and mitochondrial membrane potential) were analyzed at days 1, 4 and 7 of preservation.

#### 2.1.2 Experimental Design 2

This experiment is aimed to analyze the calcium influx kinetics and specific response to capacitating conditions in spermatozoa stored at 17°C in BTS without or with RSV at days 1, 4, and 7 of storage. A total of 8 ejaculates (n=8) from 8 different animals were diluted in BTS at final concentration of  $20 \times 10^6$  spermatozoa/mL and 33 and 100  $\mu\text{M}$  RSV were added. The specific response to bicarbonate under capacitating conditions in vitro was assessed by monitoring the plasma membrane integrity and intracellular calcium concentrations after incubation of spermatozoa for 3 and 60 min.

### 2.2 Chemicals and Sources

Beltsville-Thawing Solution was obtained from Minitüb GmbH (Tiefenbach, Germany). Live/dead spermatozoa viability kit including both propidium iodide (PI) and SYBR-14 probes, M540 and YoPro-1 probes were purchased from Molecular Probes (Leiden, The Netherlands). Resveratrol (3,4',5-Trihydroxy-trans-stilbene), ATP kit (FL-AA), phosphatase inhibitor cocktail 2 (P5726) and FITC-PNA were from Sigma-Aldrich® (St Louis, MI, USA); coulter isoton II diluent was from Beckman Coulter Inc. (Brea, CA, USA). JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodine) probe was purchased from Life Technologies Ltd (Grand Island, NY, USA), Fluo-3/AM from Axxora (Lörrach, Germany), 96 well plates (clear bottom, no. 655088) from Greiner bio-one, and Percoll®-saline from GE Healthcare (Munich, Germany). The rest of the chemicals were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and Roth (Karlsruhe, Germany).

### 2.3 Animals, Sample Collection and Semen Preparation

Fourteen boars (Duroc, Pietrain and German Large White breed, 2-4 years of age) housed at a commercial insemination station (Tecnogenext, S.L (Spain)) and at the Unit for Reproductive Medicine of Clinics

(University of Veterinary Medicine Hannover, Germany) were used as ejaculate donors. Artificial insemination using liquid preserved semen from these boars demonstrated their fertility. Fresh ejaculates were collected with the gloved hand technique and immediately placed in a water bath at 37°C. After collection, a computer-assisted sperm analysis system (CASA) (ISAS Psus®, Proiser R+D S.L., Paterna, Valencia) was used for the evaluation of sperm concentration and motility. Morphology was evaluated by eosin-nigrosin staining, a total of 200 spermatozoa per ejaculate were evaluated by oil immersion microscopy objective 100X. Only ejaculates with at least 80% morphologically normal spermatozoa, 70% motile spermatozoa and a total number of spermatozoa higher than  $10 \times 10^9$  were used. Immediately after collection, sub-samples of each ejaculate were diluted in BTS extender (Minitüb GmbH, Germany) and treated as follows: a) supplementation with different concentrations of resveratrol (70 mM stock solution in dimethyl sulfoxide, DMSO), b) addition of the highest DMSO concentration (0.14 %) used to supplement resveratrol, and c) untreated sub-sample (BTS). Sperm sub-samples were cooled at room temperature for 1.5 h and subsequently stored in a refrigerated incubator (FOC 225 I, VELS Scientifica, Usmate, Italy) at 17°C in sealed containers excluding air, in an anaerobic medium, for seven days.

#### 2.4 Assessment of Spermatozoa Motility

Prior to motility analysis, seminal doses (500 µL) were incubated for 40min with 5 % CO<sub>2</sub> at 38.5°C (Mini Galaxy A, RS Biotech, United Kingdom). After gentle mixing, semen was examined for motility pattern using a CASA system (ISAS® program, Proiser R+D, Paterna, Valencia, Spain) following the manufacture's guidelines. A total of 2 µL of sample were placed in a pre-warmed counting chamber (Leja®, Nieuw-Vennep, The Netherlands). At least 300 spermatozoa per sample were analyzed and the following sperm motility parameters were recorded: total motile spermatozoa (percentage of spermatozoa with an average path velocity > 10 µM/s), progressive motile spermatozoa (percentage of spermatozoa with a straightness coefficient > 80 %), VCL (curvilinear velocity in µM/s), VSL (straight-line velocity in µM/s), VAP (average path velocity in µM/s), LIN (linearity coefficient in %) and STR (straightness coefficient in %).

Examinations at the University for Veterinary Medicine in Hannover were carried out with SpermVision® program as described in Henning et al. (2012). A 0.63 camera adapter (U-PMTVC tv-0.63, Olympus, Hamburg, Germany) was used.

#### 2.5 Flow Cytometry Analysis

In experiment one, a Coulter EPIC XL flow cytometer (Beckman Coulter Ltd.) was used to evaluate sperm viability, plasma membrane phospholipid disorder, acrosome membrane integrity and mitochondrial membrane potential and data were analyzed using a FACStation™ and EXPOTM 32 ADC software (Beckman Coulter, Inc.). Fluorophores were excited by a 15 mW argon ion laser operating at 488 nm. A total of 10,000 gated events (bases on the forward scatter and side scatter of the sperm population recorded in the linear mode) were collected per sample with a sample running rate of approximately 500 events/sec. Fluorescence data were collected in the logarithmic mode.

In experiment two, a DAKO Galaxy flow cytometer (DAKO, Hamburg, Germany) controlled by FloMax software (version 2.4, Partec, Münster, Germany) was used for intracellular calcium analysis (Hoechst 33342, PI, Fluo-3) and assessment of plasma and acrosomal membrane integrity (Hoechst 33342, PI, FITC-PNA). The cells were excited at two spots while passing the cuvette: first at a wavelength of 488 nm (argon ion laser; 20 mW) and second at a wavelength of 365 nm (mercury lamp; 100 W). Fluorescence signals were detected using a 455/10 band pass filter (Hoechst 33342), a 537.5/22.5 nm bandpass filter (Fluo-3, FITC-PNA), and a 630 nm long pass filter (PI). A logical gate was used to identify the sperm population based on positive staining for Hoechst 33342 (DNA-containing events) and on being in the expected size range for spermatozoa in the forward scatter distribution. A total of 10,000 events fitting the definition of the logical gate were counted. The overlap of spectra between PI and Fluo-3 or FITC-PNA was compensated post acquisition.

#### 2.6 Assessment of Spermatozoa Viability

As described previously (Martin-Hidalgo et al., 2011), fluorescent staining using the LIVE/DEAD Sperm Viability Kit was performed to assess porcine spermatozoa viability. Briefly, 100 µL of liquid preserved semen ( $35 \times 10^6$  cells/mL) was diluted with 400 µL isotonic buffer (coulter isoton II). 5 µL of SYBR-14 (2 µM final concentration) and 10 µL of propidium iodide (5 µM final concentration) were added to 500 µL of the diluted sample and incubated for 20 min at room temperature in the darkness. After incubation, cells were analyzed by flow cytometry and the percentage of viable spermatozoa (SYBR14-positive and PI-negative) was recorded.

### 2.7 Assessment of Spermatozoa Plasma Membrane Phospholipid Disorder

Changes in membrane phospholipid disorder were assessed by using a merocyanine 540 (M540) and YoPro-1 double staining. Aliquots of 100  $\mu\text{L}$  of each semen sample ( $35 \times 10^6$  cells/mL) were diluted in 400  $\mu\text{L}$  of isotonic buffered diluent containing 2  $\mu\text{L}$  of YoPro-1 (0.08  $\mu\text{M}$  final concentration), then mixed and incubated at 38°C for 15 min. Just before analysis, 2  $\mu\text{L}$  of M540 (4  $\mu\text{M}$  final concentration) was added to each sample and incubated for 2 min and mixed before flow cytometry analysis. Labeled spermatozoa were categorized as (1) viable cells with low plasma membrane phospholipid disorder (YoPro-1<sup>-</sup>/M540<sup>-</sup>); (2) viable cells with high plasma membrane phospholipid disorder (YoPro-1<sup>-</sup>/M540<sup>+</sup>); or (3) non-viable cells with altered permeability of the plasma membrane (Yo-Pro-1<sup>+</sup>).

### 2.8 Assessment of Spermatozoa Acrosome Integrity

The acrosomal status of spermatozoa was assessed after staining the spermatozoa with fluorescein-isothiocyanate conjugated peanut agglutinin (PNA-FITC), as a marker for acrosome status, and PI. Aliquots of 100  $\mu\text{L}$  of each semen sample ( $35 \times 10^6$  cells/mL) were incubated at room temperature in the dark for 5 min with 5  $\mu\text{L}$  of PNA-FITC stock solution (3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in DMSO) and 5  $\mu\text{L}$  of PI (6  $\mu\text{M}$  final concentration). Just before flow cytometry analysis, 400  $\mu\text{L}$  of isotonic buffered diluent was added to each sample. Cells were analyzed and the percentage of live spermatozoa with damaged or reacted acrosome (PI-negative and PNA-positive spermatozoa) was recorded.

### 2.9 Assessment of Spermatozoa Mitochondrial Membrane Potential

Mitochondrial membrane potential variations were evaluated using the probe JC-1. This lipophilic cationic fluorochrome JC-1 is present as protomeric aggregates in mitochondria with high membrane potential and emits light in the orange spectrum (590 nm) when excited at 488 nm. In mitochondria with low membrane potential, JC-1 is present as monomers that emit light in the green spectrum (525 nm). From each sperm sample, 100  $\mu\text{L}$  ( $35 \times 10^6$  cells/mL) were diluted in 400  $\mu\text{L}$  of isotonic buffered diluent containing 3  $\mu\text{L}$  of JC-1 (1  $\mu\text{M}$  final concentration) and then mixed and incubated at 38°C for 30 min. The samples were mixed before flow cytometry analysis. The percentage of orange stained cells, which represents the population of male germ cells with high mitochondrial membrane potential (hMMP), was recorded.

### 2.10 Assessment of Calcium Influx in Spermatozoa

Calcium influx and the specific response to bicarbonate in liquid preserved boar spermatozoa were assessed as described in Henning et al. (2012) with minor modifications. Three types of a Tyrode's medium were used for exposing spermatozoa to capacitating or non-capacitating conditions. The complete Tyrode's medium or TyrBicCa consisted of 96 mM NaCl, 20 mM HEPES, 5 mM glucose, 3.1 mM KCl, 0.4 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gentamycin sulfate (SERVA, Heidelberg, Germany), 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  phenol red, 1.0 mM sodium pyruvate, 21.7 mM sodium lactate, 3 mg/mL bovine serum albumin (Cohn's fraction V, fatty acid free), 15 mM NaHCO<sub>3</sub> and 2 mM CaCl<sub>2</sub>. In the non-capacitating control media, either bicarbonate (TyrCa) or both, bicarbonate and CaCl<sub>2</sub> (TyrControl), were omitted. In TyrControl 1 mM Na<sub>2</sub>-EGTA (disodium ethylene glycol tetracetate) was added. All media were adjusted to a pH of 7.4 at 38°C and an osmolality of 300 $\pm$ 5 mOsmol/kg. For equilibration, TyrBicCa was kept in an incubator (38°C) under 5% CO<sub>2</sub> and 100% humidity, whereas TyrCa and TyrControl were kept sealed in a heating cabinet (38°C).

Spermatozoa were prepared by adding 2  $\mu\text{L}$  of a Fluo-3/AM stock solution (1 mM in DMSO) to 2 mL of sperm suspensions ( $20 \times 10^6$  spermatozoa/mL) and incubated in the dark at room temperature. After 30 min, spermatozoa were centrifuged through a discontinuous gradient of 35 and 70% iso-osmotic Percoll<sup>®</sup> saline essentially as described by Harrison et al. (1993). Spermatozoa were layered over a two-step gradient of 4 mL of 35 % Percoll-saline on 2 mL of 70% Percoll-saline. Tubes were centrifuged at 300 g for 10 min followed by 15 min at 750 g. After centrifugation, the supernatant was aspirated and sperm pellet was resuspended in TyrControl without RSV and BSA. The suspension of Fluo-3 loaded and washed sperm was kept in the dark at ambient temperature and used within 30 min of preparation. Aliquots of 5  $\mu\text{L}$  of Fluo-3-loaded sperm were diluted in 995  $\mu\text{L}$  of TyrBicCa, TyrCa or TyrControl medium without RSV added and supplemented with PI (final concentration 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and Hoechst 33342 (final concentration 0.75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Samples were analyzed after 3 and 60 min on the DAKO Galaxy flow cytometer. Signals for PI distinguished between death cells with defective plasma membranes (PI-positive) and live cells with intact plasma membranes (PI-negative), whereas Fluo-3 signal subdivided the PI-negative spermatozoa population into cells with a low Fluo-3 fluorescence signal (live, low-Ca<sup>2+</sup> sperm cells; Fluo-3-negative) and those with a higher Fluo-3 fluorescence signal (live, high-Ca<sup>2+</sup> sperm cells; Fluo-3-positive). The change in the amount of a spermatozoa subpopulation between 3 and 60 min of incubation in TyrBicCa, TyrCa or TyrControl medium indicates the responsiveness of a sperm sample to

capacitating conditions (Henning et al., 2012; Schmid et al., 2013). Responsiveness was calculated as changes in the live, low-  $\text{Ca}^{2+}$  subpopulation (PI-negative/ Fluo-3-negative;  $\Delta = 60 \text{ min}-3 \text{ min}$ ). The specific response to bicarbonate upon exposure of spermatozoa to capacitating conditions was calculated as the difference in the responsiveness to incubation conditions in TyrBicCa ( $\Delta 60-3$ ) and TyrCa ( $\Delta 60-3$ ) as described in Schmid et al. (2013).

### 2.11 Quantification of ATP Spermatozoa Content

ATP content of spermatozoa was quantified at storage temperature as well as after incubation at 38°C. The assessments were done according to Long and Guthrie (2006) with minor modifications. Immediately after removal from the refrigerated incubator, a total of 100  $\mu\text{L}$  of stored semen ( $20 \times 10^6$  spermatozoa/mL) was mixed with 1  $\mu\text{L}$  of phosphatase inhibitors. Another 100  $\mu\text{L}$  of stored semen were incubated with 5 %  $\text{CO}_2$  at 38.5°C for 40 min and then 1  $\mu\text{L}$  of phosphatase inhibitors was added. After 30 min incubation with inhibitor at room temperature, spermatozoa were frozen and stored at -20°C. For ATP extraction, samples were boiled for 10 min with 900  $\mu\text{L}$  of boiling buffer (50 mM Tricine, 10 mM  $\text{MgSO}_4$ , 2 mM EDTA, pH= 7.8) and then chilled on ice for 10 min and centrifuged at 5,000 g for 30 min at 4 °C. ATP content was measured in 25  $\mu\text{L}$  of the supernatant using the ATP bioluminescent assay kit (FL-AA) from Sigma-Aldrich® following the manufacturer's guidelines. The 96 well microtiter plates were measured in a SpectraFluor Plus plate reader (Tecan Group Ltd., Maennedorf, Switzerland).

### 2.12 Statistical Analysis

A power analysis was conducted to determine the appropriate number of animals and samples. The mean and standard error of the mean were calculated for descriptive analysis. Q-Q plots were used to check for departures from the normal distribution. All the sperm variables satisfied the normality requirement for a parametric analysis of variance.

The effects of treatment (untreated and Resveratrol) and storage time (1, 4 and 7 days) on several seminal characteristics (motility, ATP content, viability, plasma membrane phospholipid disorder, acrosomal membrane integrity, mitochondrial membrane status and intracellular calcium content) were analyzed statistically using a General Linear Model, mixed-effects model (with boars and ejaculates within boars as random effects and treatment and storage time as fixed effects) was applied to the experimental design. Bonferroni's test was used to perform post hoc tests. The Pearson's correlation test was used to study the correlation among the quantity of ATP with different motility parameters (percentage of motile spermatozoa, VCL, VAP and VSL) and resveratrol concentration used. All analyses were performed using SPSS v15.0 for Windows software (SPSS Inc. Chicago, IL). The level of significance was set at  $p < 0.05$ , except for the study of correlation where the level of significance was set at  $p < 0.01$ .

## 3. Results

In this work, the possible effect of solvent DMSO (0.14 %) was tested for all investigated parameters and no effect was observed compared with semen stored in BTS alone (data not shown).

### 3.1 Effect of Resveratrol on Spermatozoa Motility During Boar Semen Storage at 17°C in BTS

To evaluate the effect of RSV in spermatozoa motility parameters during semen storage, boar seminal doses were diluted in BTS without or with different concentrations of RSV (10, 33, 66 and 100  $\mu\text{M}$ ). After BTS dilution (day 0) and after 1, 4 and 7 days of storage at 17°C, seminal doses were incubated with 5%  $\text{CO}_2$  at 38.5°C during 40 min to ensure motility and then motility parameters were evaluated (experimental design 1).

At low doses (10 and 33  $\mu\text{M}$ ) RSV addition was without effect in the percentage of motile spermatozoa (Table 1). However, addition of higher doses of RSV (66 and 100  $\mu\text{M}$ ) caused a statistically significant reduction in the percentage of motile spermatozoa starting at 4 days of storage (Table 1). A similar RSV effect was observed in the velocity parameters (Table 1) with a clear and statistically significant reduction in VCL (Table 1), VAP and VSL (data not shown) in spermatozoa stored in presence of 66 and 100  $\mu\text{M}$  of RSV.

Addition of RSV was without any effect in both the linearity of spermatozoa movement, as well as in the percentage of spermatozoa showing progressive movement at any dose or storage time (Table 2).

Table 1. Spermatozoa motility parameters after addition of different resveratrol concentrations to boar semen doses preserved at 17°C for 7 days

	MOTILE SPERMATOZOA (%)				CURVILINEAR VELOCITY ( $\mu\text{m/s}$ )			
	Day 0	Day 1	Day 4	Day 7	Day 0	Day 1	Day 4	Day 7
BTS		91.0 $\pm$ 1.7 <sup>a,1</sup>	89.8 $\pm$ 1.5 <sup>ab,1</sup>	79.1 $\pm$ 3.2 <sup>b,1</sup>		76.4 $\pm$ 4.8 <sup>a,1</sup>	78.1 $\pm$ 4.2 <sup>a,1</sup>	75.4 $\pm$ 4.7 <sup>a,1</sup>
RSV10		91.0 $\pm$ 2.4 <sup>a,1</sup>	88.5 $\pm$ 2.2 <sup>ab,1</sup>	79.8 $\pm$ 3.7 <sup>b,1</sup>		76.6 $\pm$ 4.7 <sup>a,1</sup>	72.2 $\pm$ 4.1 <sup>a,1</sup>	76.3 $\pm$ 4.3 <sup>a,1</sup>
RSV33	93.4 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	91.3 $\pm$ 2.3 <sup>a,1</sup>	86.3 $\pm$ 2.0 <sup>a,1</sup>	72.9 $\pm$ 5.4 <sup>b,1</sup>	74.6 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>	78.3 $\pm$ 4.7 <sup>a,1</sup>	70.4 $\pm$ 4.1 <sup>a,1</sup>	65.6 $\pm$ 4.6 <sup>a,1,2</sup>
RSV66		86.8 $\pm$ 3.3 <sup>a,b,1</sup>	80.6 $\pm$ 2.7 <sup>b,1,2</sup>	60.4 $\pm$ 6.1 <sup>c,2</sup>		76.9 $\pm$ 3.7 <sup>a,1</sup>	62.6 $\pm$ 3.5 <sup>a,1,2</sup>	53.5 $\pm$ 3.9 <sup>b,2,3</sup>
RSV100		83.1 $\pm$ 3.6 <sup>a,b,1</sup>	71.9 $\pm$ 4.7 <sup>b,2</sup>	51.2 $\pm$ 5.7 <sup>c,2</sup>		64.3 $\pm$ 3.6 <sup>a,1</sup>	47.3 $\pm$ 4.7 <sup>b,2</sup>	44.3 $\pm$ 3.2 <sup>b,3</sup>

Boar seminal doses were preserved at 17°C during 7 days in BTS in absence or presence of different concentrations of RSV (10, 33, 66 and 100 $\mu\text{M}$ ). Percentage of motile spermatozoa and curvilinear spermatozoa velocity (VCL in  $\mu\text{m/s}$ ) were measured by CASA system (ISAS<sup>®</sup>) as described in Materials and Methods. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) (n=12). Within a parameter (column) or within a RSV concentration given (row), different superscripts (<sup>a,b,c</sup>) mean statistical differences between days. Within a parameter and for a given day of preservation, differences between RSV concentrations are indicated by different numerical superscript (<sup>1,2,3</sup>).

Table 2. Spermatozoa motility parameters after addition of different resveratrol concentrations to boar semen doses preserved at 17°C for 7 days.

	PROGRESSIVE MOTILITY (%)				LINEARITY INDEX (%)			
	Day 0	Day 1	Day 4	Day 7	Day 0	Day 1	Day 4	Day 7
BTS	52.8 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>	55.5 $\pm$ 3.0 <sup>a,1</sup>	56.8 $\pm$ 4.0 <sup>a,1</sup>	47.6 $\pm$ 3.3 <sup>a,1</sup>	61.3 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	61.9 $\pm$ 1.6 <sup>a,1</sup>	61.8 $\pm$ 2.0 <sup>a,1</sup>	56.1 $\pm$ 1.9 <sup>a,1</sup>
RSV10		58.1 $\pm$ 2.9 <sup>a,1</sup>	56.0 $\pm$ 3.0 <sup>a,1</sup>	48.8 $\pm$ 3.4 <sup>a,1</sup>		62.8 $\pm$ 1.5 <sup>a,1</sup>	61.5 $\pm$ 1.6 <sup>a,1</sup>	56.7 $\pm$ 1.8 <sup>a,1</sup>
RSV33		54.8 $\pm$ 3.3 <sup>a,1</sup>	58.1 $\pm$ 3.6 <sup>a,1</sup>	51.3 $\pm$ 1.6 <sup>a,1</sup>		61.0 $\pm$ 1.6 <sup>a,1</sup>	61.3 $\pm$ 2.0 <sup>a,1</sup>	56.5 $\pm$ 0.9 <sup>a,1</sup>
RSV66		54.5 $\pm$ 3.1 <sup>a,1</sup>	61.0 $\pm$ 3.2 <sup>a,1</sup>	51.2 $\pm$ 1.8 <sup>a,1</sup>		59.0 $\pm$ 1.7 <sup>a,b,1</sup>	60.9 $\pm$ 1.8 <sup>a,1</sup>	54.2 $\pm$ 1.3 <sup>b,1</sup>
RSV100		58.6 $\pm$ 2.0 <sup>a,1</sup>	57.9 $\pm$ 3.5 <sup>a,1</sup>	48.2 $\pm$ 1.6 <sup>a,1</sup>		60.0 $\pm$ 1.3 <sup>a,1</sup>	57.1 $\pm$ 2.0 <sup>a,1</sup>	51.0 $\pm$ 1.1 <sup>b,1</sup>

Boar seminal doses were preserved at 17°C during 7 days in BTS in absence or presence of different concentrations of RSV (10, 33, 66 and 100 $\mu\text{M}$ ). Progressive motility and linearity index was measured by CASA system (ISAS<sup>®</sup>) as described in Materials and Methods. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) (n=12). Within a parameter (column) or within a RSV concentration given (row), different superscripts (<sup>a,b,c</sup>) mean statistical differences between days. Within a parameter and for a given day of preservation, differences between RSV concentrations are indicated by different numerical superscript (<sup>1,2,3</sup>).

Table 3. Spermatozoa viability and the integrity of acrosome and plasma membranes after addition of different resveratrol concentrations to boar semen doses preserved at 17°C for 7 days

	CELL VIABILITY (SYBR-14 <sup>+</sup> /PI)				ACROSOME INTEGRITY (PNA <sup>+</sup> /PI)				PLASMA MEMBRANE PHOSPHOLIPID DISORDER (M540 <sup>+</sup> /YOPRO)			
	Day 0	Day 1	Day 4	Day 7	Day 0	Day 1	Day 4	Day 7	Day 0	Day 1	Day 4	Day 7
BTS	93.4 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	92.6 $\pm$ 0.5 <sup>a,1</sup>	91.8 $\pm$ 0.8 <sup>a,1</sup>	89.2 $\pm$ 1.3 <sup>a,1</sup>	3.7 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	4.2 $\pm$ 0.7 <sup>a,1</sup>	4.9 $\pm$ 0.8 <sup>a,1</sup>	8.1 $\pm$ 1.7 <sup>a,1</sup>	8.6 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	8.8 $\pm$ 0.6 <sup>a,1</sup>	15.0 $\pm$ 2.9 <sup>a,b,1</sup>	22.0 $\pm$ 4.1 <sup>b,1</sup>
RSV10		91.5 $\pm$ 0.6 <sup>a,1</sup>	89.2 $\pm$ 1.1 <sup>a,1</sup>	88.7 $\pm$ 0.8 <sup>a,1</sup>		4.0 $\pm$ 0.5 <sup>a,1</sup>	5.7 $\pm$ 1.0 <sup>a,b,1</sup>	9.4 $\pm$ 2.5 <sup>b,1</sup>		10.5 $\pm$ 0.7 <sup>a,1</sup>	14.2 $\pm$ 2.9 <sup>a,b,1</sup>	21.1 $\pm$ 4.7 <sup>b,1</sup>
RSV33		91.7 $\pm$ 0.5 <sup>a,1</sup>	88.9 $\pm$ 1.0 <sup>a,1</sup>	88.8 $\pm$ 0.8 <sup>a,1</sup>		4.0 $\pm$ 0.5 <sup>a,1</sup>	5.2 $\pm$ 0.7 <sup>a,b,1</sup>	9.2 $\pm$ 2.2 <sup>b,1</sup>		10.1 $\pm$ 0.8 <sup>a,1</sup>	15.9 $\pm$ 3.3 <sup>a,1</sup>	25.9 $\pm$ 5.8 <sup>b,1</sup>
RSV66		91.3 $\pm$ 0.4 <sup>a,1</sup>	89.5 $\pm$ 1.0 <sup>a,1</sup>	88.1 $\pm$ 1.0 <sup>a,1</sup>		4.0 $\pm$ 0.4 <sup>a,1</sup>	5.6 $\pm$ 0.8 <sup>a,b,1</sup>	10.8 $\pm$ 2.7 <sup>b,1</sup>		10.5 $\pm$ 0.8 <sup>a,b,1</sup>	20.0 $\pm$ 4.2 <sup>b,c,1</sup>	28.3 $\pm$ 5.8 <sup>c,1</sup>
RSV100		91.5 $\pm$ 0.7 <sup>a,1</sup>	89.8 $\pm$ 1.1 <sup>a,1</sup>	86.1 $\pm$ 1.7 <sup>a,1</sup>		4.2 $\pm$ 0.7 <sup>a,1</sup>	4.9 $\pm$ 0.8 <sup>a,1</sup>	12.3 $\pm$ 2.9 <sup>b,1</sup>		9.9 $\pm$ 0.8 <sup>a,1</sup>	22.8 $\pm$ 4.6 <sup>b,1</sup>	41.6 $\pm$ 6.1 <sup>c,2</sup>

Boar seminal doses were preserved at 17°C during 7 days in BTS in absence or presence of different concentrations of RSV (10, 33, 66 and 100  $\mu\text{M}$ ). Percentages of cell viability, plasma membrane phospholipid disorder and acrosomal integrity of spermatozoa were measured by flow cytometry as described in Materials and Methods. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) (n=12). Within a RSV concentration given (row), differences between days for a given parameter (column) are indicated by different superscripts (<sup>a,b,c</sup>).

Within a parameter and for a given day of preservation (column), differences between RSV concentrations are indicated by different numerical superscript (<sup>1,2,3</sup>).

### 3.2 Effects of Resveratrol on the Viability, Plasma Membrane Phospholipid Disorder and Acrosome Membrane Integrity of Spermatozoa During Boar Semen Storage at 17°C in BTS

To evaluate the effect of RSV in spermatozoa viability, plasma membrane phospholipid disorder and acrosome membrane integrity during semen storage we used the experimental design 1 described in materials and methods.

The storage of boar semen in the presence of different doses of RSV (10, 33, 66 and 100 µM) did not affect either the percentage of viable spermatozoa with an intact plasma membrane or the percentage of spermatozoa presenting altered acrosomal membrane, compared with BTS alone at any storage time or dose (Table 3).

Only the highest doses of RSV used (100 µM) caused a statistically significant increase in the percentage of spermatozoa showing a higher disorder on plasma membrane phospholipid on day 7 of semen storage (Table 3).

### 3.3 Calcium Influx and the Specific Response to Bicarbonate in Boar Semen Stored at 17°C in BTS in Presence of RSV

To evaluate the effect of RSV on calcium influx and the specific response of boar spermatozoa to bicarbonate, boar seminal doses were diluted in BTS without or with different concentrations of RSV (33 and 100 µM). At 1, 4 and 7 days of storage at 17°C, specific response to bicarbonate upon exposure of spermatozoa to capacitating conditions was calculated as the difference in the responsiveness to incubation conditions in TyrBicCa ( $\Delta 60-3$ ) and TyrCa ( $\Delta 60-3$ ). Only boar seminal doses incubated with the highest dose of RSV show a statically significant reduction in the specific response to bicarbonate after 7 days of storage at 17°C, with a 3-fold decrease compared with BTS alone (Table 4).

Table 4. Specific response to bicarbonate in boar semen doses supplemented with different resveratrol concentrations and preserved at 17°C

	SPECIFIC RESPONSE BICARBONATE			DESTABILIZING EFFECT OF EXTRACELLULAR CALCIUM		
	Day 1	Day 4	Day 7	Day 1	Day 4	Day 7
<b>BTS</b>	43.9±4.1 <sup>a,1</sup>	33.0±4.2 <sup>a,1</sup>	21.5±4.2 <sup>b,1</sup>	1.3±0.9 <sup>a,1</sup>	3.7±1.4 <sup>a,1</sup>	1.6±1.3 <sup>a,1</sup>
<b>RSV33</b>	48.3±3.5 <sup>a,1</sup>	39.7±2.2 <sup>a,1</sup>	23.9±3.7 <sup>b,1</sup>	3.8±1.7 <sup>a,1</sup>	1.8±1.1 <sup>a,1</sup>	3.5±2.9 <sup>a,1</sup>
<b>RSV100</b>	44.3±6.4 <sup>a,1</sup>	29.9±4.6 <sup>a,1</sup>	6.8±5.2 <sup>b,2</sup>	2.0±1.2 <sup>a,1</sup>	-0.1±0.5 <sup>a,1</sup>	11.5±4.0 <sup>b,2</sup>

Responsiveness of spermatozoa was calculated as changes in the live, low-  $\text{Ca}^{2+}$  subpopulation (PI-negative/Fluo-3-negative) at the beginning (3min) and after 60 min of incubation ( $\Delta = 60 \text{ min} - 3 \text{ min}$ ) in TyrBicCa, TyrCa or TyrControl. The specific response to bicarbonate describes the difference in the responsiveness in TyrBicCa and TyrCa. The destabilizing effect of extracellular calcium was calculated as the difference in the responsiveness in TyrCa and TyrControl. Results are mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) (n=8). Within a treatment (row), differences between days for a given spermatozoa response (column) are indicated by different superscripts (<sup>a,b</sup>). Within a given time (column), differences between RSV concentrations are indicated by different numerical superscript (<sup>1,2</sup>).

In addition, the destabilizing effect that can be attributed to the presence of extracellular calcium was monitored as the difference in the responsiveness to incubation conditions in TyrCa and TyrControl. After 7 days storage at 17°C, seminal doses stored in presence of RSV 100 µM showed a statistically significant increase in the amount of spermatozoa that destabilized due to the presence of extracellular calcium. Values were 7-fold higher when compared with BTS alone (Table 4).

### 3.4 Effects of Resveratrol on Mitochondrial Membrane Potential and ATP Content of Boar Semen Preserved at 17°C in BTS

To evaluate the effect of RSV on mitochondrial membrane potential during semen storage, boar seminal doses were diluted in BTS without or with different concentrations of RSV (10, 33, 66 and 100 µM; experiment 1). After BTS dilution (day 0) and after 1, 4 and 7 days of semen storage at 17°C, mitochondrial membrane potential of spermatozoa was evaluated. Supplementation with any dose of RSV causes a significant decrease in the percentage



of spermatozoa displaying high MMP at any time of semen storage (Table 5), showing the higher and statistically significant effect at 1-day storage at 17°C for any dose of RSV use (Table 5).

Table 5. Mitochondrial membrane potential after addition of different resveratrol concentrations to boar semen doses preserved at 17°C for 7 days

	HIGH MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL (%)			
	Day 0	Day 1	Day 4	Day 7
<b>BTS</b>	73.5±2.6 <sup>a</sup>	65.8 ± 3.9 <sup>a,1</sup>	76.4± 2.8 <sup>a,1</sup>	76.2 ± 4.2 <sup>a,1</sup>
<b>RSV10</b>		35.7± 8.7 <sup>b,2</sup>	40.4± 11.1 <sup>a,1</sup>	44.9± 10.5 <sup>a,2</sup>
<b>RSV33</b>		38.3 ± 8.0 <sup>b,c,1,2</sup>	52.2 ± 6.8 <sup>a,c,1</sup>	50.0 ± 9.0 <sup>a,b,1,2</sup>
<b>RSV66</b>		32.4± 8.7 <sup>b,2</sup>	55.5± 6.1 <sup>a,b,1</sup>	59.3 ± 6.1 <sup>a,b,1,2</sup>
<b>RSV100</b>		31.7± 8.1 <sup>b,c,2</sup>	50.1± 8.1 <sup>a,c,1</sup>	62.0± 6.0 <sup>a,1,2</sup>

Boar seminal doses were preserved at 17°C during 7 days in BTS in absence or presence of different concentrations of RSV (10, 33, 66 and 100µM). Percentage of spermatozoa with high mitochondrial membrane potential was measured by flow cytometry as described in Materials and Methods. Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) (n=12). Within a treatment (row), differences between days (column) are indicated by different superscripts (<sup>a,b,c</sup>). Within a given time (column), differences between RSV concentrations are indicated by different numerical superscript (<sup>1,2,3</sup>).

To evaluate the effect of RSV on ATP content during semen storage, boar seminal doses were diluted in BTS without or with different concentrations of RSV (33 and 100 µM; experiment 2). ATP content was determined directly from the stored samples (17°C) and after 40 min incubation at 38.5°C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere to activate spermatozoa. Compared with BTS alone, both concentrations of RSV (33 and 100 µM) caused a clear and statistically significant decrease in the ATP content of spermatozoa at any time storage. The decrease in ATP content was present under unstimulated and stimulated conditions (Table 6). Analysis of data showed a statistically significant negative correlation between ATP concentration of spermatozoa and the dose of RSV used (r=-0.767, p<0.01). Moreover, further analysis of data from semen stored at 17°C showed a significant positive correlation between the spermatozoa ATP content (Table 6) and the percentage of motile spermatozoa (r=0.463; p<0.01), VCL (r=0.380; p<0.01), VAP (r=0.489; p<0.01) and VSL (r=0.557; p<0.01).

Table 6. ATP levels in spermatozoa of boar semen doses supplemented with different resveratrol concentrations and preserved at 17°C

	ATP Content (pmol/10 <sup>6</sup> spermatozoa)			
	Day 1	Day 4	Day 7	
<b>17°C (Unstimulated)</b>	<b>BTS</b>	119.0±21.4 <sup>a,1</sup>	138.0±13.4 <sup>a,1*</sup>	107.2±13.1 <sup>a,1</sup>
	<b>RSV33</b>	22.9±5.0 <sup>a,2</sup>	49.3±13.3 <sup>a,2*</sup>	34.0±5.0 <sup>a,2</sup>
	<b>RSV100</b>	8.2±1.9 <sup>a,2</sup>	8.7±2.3 <sup>a,3</sup>	9.5±2.7 <sup>a,2</sup>
<b>40 min, 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> (Stimulated)</b>	<b>BTS</b>	104.6±17.2 <sup>a,1</sup>	94.4±18.6 <sup>a,1*</sup>	98.7±17.0 <sup>a,1</sup>
	<b>RSV33</b>	20.8±3.8 <sup>a,2</sup>	19.8±3.8 <sup>a,2*</sup>	26.2±5.1 <sup>a,2</sup>
	<b>RSV100</b>	6.9±1.8 <sup>a,2</sup>	7.3±2.2 <sup>a,2</sup>	4.5±2.1 <sup>a,2</sup>

Boar seminal doses were preserved at 17°C during 7 days in BTS in absence or presence of different concentrations of RSV (33 and 100 µM). Spermatozoa ATP content was measured as described in Materials and Methods. Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) (n=6). Within a RSV concentration (row), different superscripts (<sup>a,b,c</sup>) indicate statistical differences between days. Within a preservation day (column) differences between RSV concentrations are indicated by different numerical superscript (<sup>1,2</sup>). Within a day of preservation and treatment, differences between unstimulated and stimulated are indicated as (\*).

#### 4. Discussion

At present, a large number of studies show that the natural polyphenol resveratrol may be beneficial to many aspects of cell function and animal health; however, this compound displays a dichotomy: low doses can improve cell function while high doses increase cell death with a concomitant decrease in the mitochondrial membrane function (Fulda et al., 2010; Low et al., 2010; Pervaiz & Holme, 2009; Sareen et al., 2006; Zini et al., 1999; Zunino & Storms, 2006). Regarding male reproductive system, some studies have focused in the actions of resveratrol with divergent results (Branco et al., 2010; Collodel et al., 2011; Garcez et al., 2010; Juan et al., 2005; Ourique et al., 2013; Silva et al., 2012).

In the present study, results obtained with conventional parameters to determine the quality of boar semen doses do not allow to respond to the question of whether RSV addition improves preservation of semen doses stored at 17°C or whether has an adverse effect. 1) Our data do not show any adverse effect of RSV on the plasma membrane integrity (viability) of boar spermatozoa preserved in seminal doses in BTS at 17°C with no cytotoxic activity at any dose or time evaluated; thus boar spermatozoa are less sensitive to the possible harmful of RSV than swim-up selected human spermatozoa where treatment with 100 µM RSV caused almost a 100% of spermatozoa death (Collodel et al., 2011); 2) Moreover, our study shows that supplementation of boar semen with high doses of RSV causes a small decrease in the percentage of total motile spermatozoa as well as in spermatozoa velocities after 4 and 7 days storage whereas low doses of RSV are without any effect on sperm motility parameters. Similar results were obtained in swim-up selected human spermatozoa where high doses of RSV were able to inhibit progressive motility whereas low doses of RSV cause high values of progressive motility (Collodel et al., 2011); however, the addition of RSV before ram sperm cryopreservation was without effect on progressive motility (Silva et al., 2012), whereas addition of RSV to ram spermatozoa kept at 5°C for 9 days induced a significant lower reduction in spermatozoa motility (Sarlos et al., 2002); 3) Regarding RSV effect in the plasma membrane phospholipid disorder and acrosomal membrane integrity during boar semen storage, results obtained are similar to those in sperm motility. Whereas high doses of RSV show a slight negative effect in the percentage of spermatozoa showing high plasma membrane phospholipid disorder after 7 days liquid storage, however, RSV doses of 10-66 µM are without any effect in these parameters. In the case of ram semen cryopreserved with RSV there were no differences among different doses (from 5 to 20 µg/mL) with regards both plasma membrane or acrosome integrity (Silva et al., 2012) or even a decrease was observed in the percentage of ram spermatozoa with acrosomal damage after long term storage at 5°C (Sarlos et al., 2002). In summary, the use of conventional sperm parameters to test the quality of boar semen doses incubated in presence of RSV does not allow us to point to a potential beneficial effect of this polyphenol in the cellular function of spermatozoa during boar semen storage at 17°C.

Contradictory results with RSV supplementation could be attributed to RSV action being affected by several factors including animal species under study, extender medium used or to the treatment of sperm samples (cryopreservation, swim-up or refrigerated storage). Moreover, conventional sperm parameters used to test the quality of boar semen doses mostly are too insensitive to assess the fertilization potential of liquid stored semen (Waberski et al., 2011). In recent studies, effort has been focused to test whether spermatozoa membranes retain their ability to respond to oviductal signals, considering dynamic responses in spermatozoa under experimentally mimicked fertilizing conditions (Henning et al., 2012; Petrunkina et al., 2005a). Several studies have indicated that a certain subpopulation of boar spermatozoa may lose their responsiveness to the capacitating stimulus bicarbonate during hypothermic storage (Green & Watson, 2001; Guthrie & Welch, 2005; Harrison et al., 1996; Petrunkina et al., 2005b). Henning et al. (2012) showed that the comparison of calcium-dependent spermatozoa responses between three different media, capacitating Tyrode's medium, (including calcium and bicarbonate), bicarbonate-free Tyrode's medium and calcium- and bicarbonate-free medium, sensitively detected storage-related changes in the spermatozoa population. Our results show that previous incubation in the presence of RSV 33 µM is unable to revert the decline in the response to bicarbonate and therefore the increasing inherent instability brought about by liquid storage time of boar semen. Moreover, conservation of seminal doses in the presence of RSV 100 µM induces a significant higher reduction in the response to bicarbonate together with a significant increase in the response to calcium in extended boar semen stored at 17°C. As calcium is a source of cell instability this loss in the calcium homeostasis is proposed to be the best parameter to assess the destabilization of spermatozoa membrane (Henning et al., 2012). Our results show that addition of RSV to extended boar semen stored at 17°C induces a higher loss of calcium homeostasis related with a greater membrane destabilization which compromises capacitation dynamics and thereby the chances of fertilization.

Our more evident result is likely the diminution of mitochondrial membrane potential observed in spermatozoa treated with any concentration of RSV (10-100 µM). Similar results were obtained in frozen-thawed ram spermatozoa showing the control group a higher proportion of spermatozoa with high mitochondrial membrane

potential than in RSV 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  treated group (Silva et al., 2012). The decrease in the mitochondrial membrane potential caused by RSV has been widely described in somatic cells and has allowed its use in cancer treatment since RSV is able i) to regulate the mitochondrial permeability transition pore (Zunino & Storms, 2006), ii) to increase the mitochondrial superoxide production (Low et al., 2010), iii) to decrease the mitochondrial membrane potential (Sareen et al., 2006; van Ginkel et al., 2007) and iv) to disrupt the mitochondrial respiratory chain (Zheng & Ramirez, 2000; Zini et al., 1999). The ATP content diminution in RSV treated boar spermatozoa is very clear in our study, falling between 3-6 times when using 33  $\mu\text{M}$  RSV and 10 to 20 times when using 100  $\mu\text{M}$  RSV. Spermatozoa movement requires ATP hydrolysis catalysed by dynein ATPases localized at the axoneme (Tash 1989). The amount of ATP in non-treated samples does not vary along the time of preservation ( $p>0.05$ ), which is in agreement with previous results from Long and Guthrie (2006) in boar seminal doses, although our values are slightly higher. We have obtained much lower values of ATP in spermatozoa treated with 33 and 100  $\mu\text{M}$  RSV compared with control spermatozoa at any time of preservation, which can be the cause for a parallel decrease in sperm motility. Positive correlations were found between the amount of ATP and the percentage of motile spermatozoa in the RSV treated samples compared to control. This finding confirms the work of Gogol et al. (2009) demonstrating that when ATP levels of boar seminal doses decreases, the percentage of motile spermatozoa also decrease. In addition, we have found a significant correlation between spermatozoa ATP level and velocities that may explain why those spermatozoa from seminal doses treated with RSV that contain lower amount of ATP than control (BTS), move with lower velocities.

## 5. Conclusions

Besides its possible negative effect in spermatozoa function, addition of RSV has been recommended in human sperm prior ICSI because it reduces sperm DNA damage during the process of cryopreservation (Branco et al., 2010), prevents lipid damage induced by cryopreservation (Garcez et al., 2010) and is able to protect sperm against oxidative stress (Collodel et al., 2011). However, in boar spermatozoa, the loss in specific reactivity to capacitating stimuli together with the fall in ATP content, the mitochondrial membrane potential reduction, the increase of plasma membrane phospholipid disorder and the lower percentage of motile spermatozoa lead us to assume that RSV treated samples could be considered subfertile compared with semen stored hypothermically in the standard extender BTS. Our results do not support the use of RSV as a potential supplement to improve the quality of extended boar semen during storage at 17°C.

## Acknowledgments

This work was supported by National Grant AGL2010-15188 (from the Spanish Ministry of Education and Science) and regional Grant PRI09A077 and GR10156 (from Government of Extremadura, Spain). Martin-Hidalgo D. received a Ph D fellowship award from the Government of Extremadura-European Social Fund, Spain.

## References

- Awda, B. J., Mackenzie-Bell, M., & Buhr, M. M. (2009). Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biol. Reprod.*, *81*(3), 553-561. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.109.076471>
- Branco, C. S., Garcez, M. E., Pasqualotto, F. F., Erdtman, B., & Salvador, M. (2010). Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology*, *60*(2), 235-237. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.10.012>
- Cerolini, S., Maldjian, A., Surai, P., & Noble, R. (2000). Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim Reprod. Sci.*, *58*(1-2), 99-111. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(99\)00035-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(99)00035-4)
- Collodel, G., Federico, M. G., Geminiani, M., Martini, S., Bonechi, C., Rossi, C., Figura, N., & Moretti, E. (2011). Effect of trans-resveratrol on induced oxidative stress in human sperm and in rat germinal cells. *Reprod. Toxicol.*, *31*(2), 239-246. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.11.010>
- Fulda, S., Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2010). Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.*, *9*(6), 447-464. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3137>
- Funahashi, H., & Sano, T. (2005). Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C. *Theriogenology*, *63*(6), 1605-1616. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.06.016>
- Gadea, J. (2003). Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Span J Agric Res*, *1*, 17-27.

- Garcez, M. E., Dos Santos, B. C., Lara, L. V., Pasqualotto, F. F., & Salvador, M. (2010). Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. *Fertil. Steril.*, *94*(6), 2118-2121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.01.058>
- Gogol, P., Szczesniak-Fabianczyk, B., & Wierzchos-Hilczer, A. (2009). The photon emission, ATP level and motility of boar spermatozoa during liquid storage. *Reprod. Biol.*, *9*(1), 39-49. [http://dx.doi.org/10.1016/S1642-431X\(12\)60093-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1642-431X(12)60093-X)
- Green, C. E., & Watson, P. F. (2001). Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*, *122*(6), 889-898. <http://dx.doi.org/10.1530/rep.0.1220889>
- Guthrie, H. D., & Welch, G. R. (2005). Effects of hypothermic liquid storage and cryopreservation on basal and induced plasma membrane phospholipid disorder and acrosome exocytosis in boar spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, *17*(4), 467-477. <http://dx.doi.org/10.1071/RD05003>
- Harrison, R. A., Ashworth, P. J., & Miller, N. G. (1996). Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol. Reprod. Dev.*, *45*(3), 378-391. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199611\)45:3<378::AID-MRD16>3.0.CO;2-V](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199611)45:3<378::AID-MRD16>3.0.CO;2-V)
- Harrison, R. A., Mairet, B., & Miller, N. G. (1993). Flow cytometric studies of bicarbonate-mediated Ca<sup>2+</sup> influx in boar sperm populations. *Mol. Reprod. Dev.*, *35*(2), 197-208. <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.1080350214>
- Henning, H., Petrunkina, A. M., Harrison, R. A., & Waberski, D. (2012). Bivalent response to long-term storage in liquid-preserved boar semen: a flow cytometric analysis. *Cytometry A*, *81*(7), 576-587. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.22058>
- Johnson, L. A., Weitze, K. F., Fiser, P., & Maxwell, W. M. (2000). Storage of boar semen. *Anim Reprod. Sci.*, *62*(1-3), 143-172. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00157-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00157-3)
- Juan, M. E., Gonzalez-Pons, E., Munuera, T., Ballester, J., Rodriguez-Gil, J. E., & Planas, J. M. (2005). trans-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. *J. Nutr.*, *135*(4), 757-760.
- Lee, K. W., & Lee, H. J. (2006). The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *Biofactors*, *26*(2), 105-121. <http://dx.doi.org/10.1002/biof.5520260202>
- Long, J. A., & Guthrie, H. D. (2006). Validation of a rapid, large-scale assay to quantify ATP concentration in spermatozoa. *Theriogenology*, *65*(8), 1620-1630. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.06.020>
- Low, I. C., Chen, Z. X., & Pervaiz, S. (2010). Bcl-2 modulates resveratrol-induced ROS production by regulating mitochondrial respiration in tumor cells. *Antioxid. Redox. Signal.*, *13*(6), 807-819. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2009.3050>
- Martin-Hidalgo, D., Baron, F. J., Bragado, M. J., Carmona, P., Robina, A., Garcia-Marin, L. J., & Gil, M. C. (2011). The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 degrees C. *Theriogenology*, *75*(8), 1550-1560. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.021>
- Ourique, G. M., Finamor, I. A., Saccol, E. M., Riffel, A. P., Pes, T. S., Gutierrez, K., ... Barreto, K. P. (2013). Resveratrol improves sperm motility, prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defences in the testes of hyperthyroid rats. *Reprod. Toxicol.*, *37*, 31-39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.01.006>
- Pervaiz, S., & Holme, A. L. (2009). Resveratrol: its biologic targets and functional activity. *Antioxid. Redox. Signal.*, *11*(11), 2851-2897. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2008.2412>
- Petrunkina, A. M., Volker, G., Brandt, H., Topfer-Petersen, E., & Waberski, D. (2005a). Functional significance of responsiveness to capacitating conditions in boar spermatozoa. *Theriogenology*, *64*(8), 1766-1782. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.007>
- Petrunkina, A. M., Volker, G., Weitze, K. F., Beyerbach, M., Topfer-Petersen, E., & Waberski, D. (2005b). Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. *Theriogenology*, *63*(8), 2278-2299. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.10.008>
- Pursel, V. G., & Johnson, L. A. (1975). Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim Sci.*, *40*(1), 99-102.
- Pursel, V. G., Schulman, L. L., & Johnson, L. A. (1978). Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *J. Anim Sci.*, *47*(1), 198-202.

- Roca, J., Rodriguez, M. J., Gil, M. A., Carvajal, G., Garcia, E. M., Cuello, C., Vazquez, J. M., & Martinez, E. A. (2005). Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *J. Androl*, 26(1), 15-24.
- Sareen, D., Van Ginkel, P. R., Takach, J. C., Mohiuddin, A., Darjatmoko, S. R., Albert, D. M., & Polans, A. S. (2006). Mitochondria as the primary target of resveratrol-induced apoptosis in human retinoblastoma cells. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, 47(9), 3708-3716. <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.06-0119>
- Sarlos, P., Molnar, A., Kokai, M., Gabor, G., & Ratky, J. (2002). Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Vet. Hung.*, 50(2), 235-245. <http://dx.doi.org/10.1556/AVet.50.2002.2.13>
- Schmid, S., Henning, H., Oldenhof, H., Wolkers, W. F., Petrunkina, A. M., & Waberski, D. (2013). The specific response to capacitating stimuli is a sensitive indicator of chilling injury in hypothermally stored boar spermatozoa. *Andrology*, 1(3), 376-386. <http://dx.doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00045.x>
- Silva, E. C., Cajueiro, J. F., Silva, S. V., Soares, P. C., & Guerra, M. M. (2012). Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology*, 77(8), 1722-1726. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.023>
- Tash, J. S. (1989). Protein phosphorylation: the second messenger signal transducer of flagellar motility. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 14(3), 332-339. <http://dx.doi.org/10.1002/cm.970140303>
- Van Ginkel, P. R., Sareen, D., Subramanian, L., Walker, Q., Darjatmoko, S. R., Lindstrom, M. J., ... Polans, A. S. (2007). Resveratrol inhibits tumor growth of human neuroblastoma and mediates apoptosis by directly targeting mitochondria. *Clin. Cancer Res.*, 13(17), 5162-5169. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0347>
- Waberski, D., Schapmann, E., Henning, H., Riesenbeck, A., & Brandt, H. (2011). Sperm chromatin structural integrity in normospermic boars is not related to semen storage and fertility after routine AI. *Theriogenology*, 75(2), 337-345. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.09.004>
- Waterhouse, K. E., De Angelis, P. M., Haugan, T., Paulenz, H., Hofmo, P. O., & Farstad, W. (2004). Effects of in vitro storage time and semen-extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry. *Theriogenology*, 62(9), 1638-1651. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.03.001>
- Zheng, J., & Ramirez, V. D. (2000). Inhibition of mitochondrial proton F0F1-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *Br. J. Pharmacol*, 130(5), 1115-1123. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0703397>
- Zini, R., Morin, C., Bertelli, A., Bertelli, A. A., & Tillement, J. P. (1999). Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp. Clin. Res.*, 25(2-3), 87-97.
- Zunino, S. J., & Storms, D. H. (2006). Resveratrol-induced apoptosis is enhanced in acute lymphoblastic leukemia cells by modulation of the mitochondrial permeability transition pore. *Cancer Lett.*, 240(1), 123-134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2005.09.001>

## Copyrights

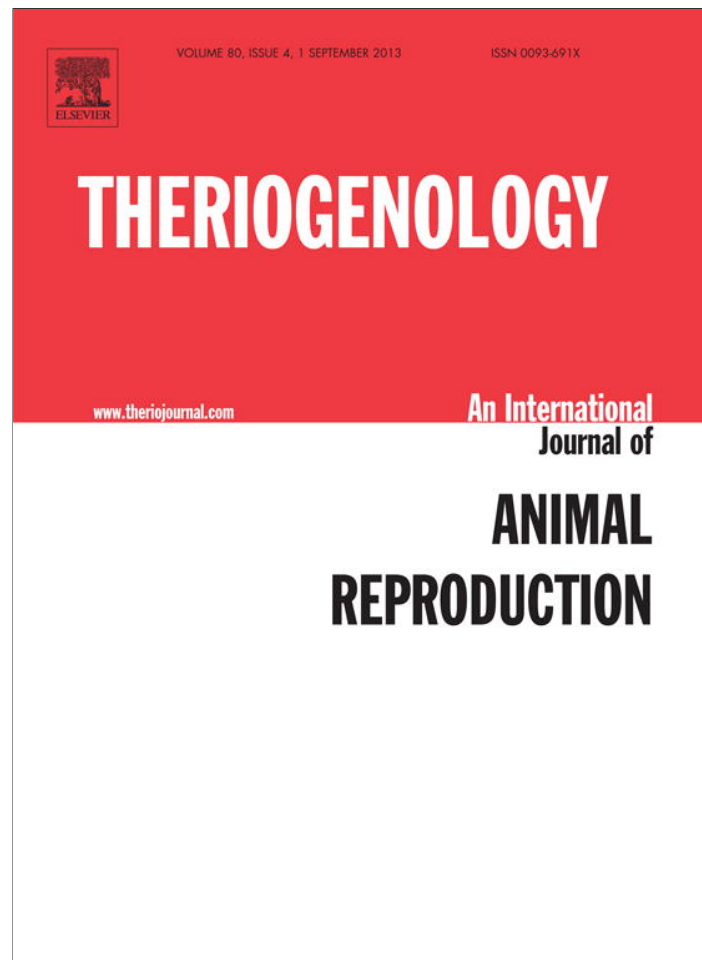
Copyright for this article is retained by the author(s), with first publication rights granted to the journal.

This is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

**Anexo-4**



Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

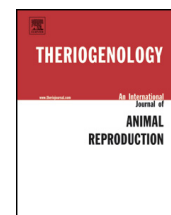
<http://www.elsevier.com/authorsrights>





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Theriogenology

journal homepage: [www.theriojournal.com](http://www.theriojournal.com)

# Adenosine monophosphate-activated kinase, AMPK, is involved in the maintenance of the quality of extended boar semen during long-term storage

David Martin-Hidalgo<sup>a</sup>, Ana Hurtado de Llera<sup>a</sup>, Marc Yeste<sup>b</sup>, M. Cruz Gil<sup>a</sup>, M. Julia Bragado<sup>a,1</sup>, Luis J. Garcia-Marin<sup>a,\*,1</sup>

<sup>a</sup>Research Group of Intracellular Signalling and Technology of Reproduction (SINTREP), Veterinary School, University of Extremadura, Caceres, Spain

<sup>b</sup>Department of Animal Medicine and Surgery, School of Veterinary Medicine, Autonomous University of Barcelona, Bellaterra, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 29 October 2012

Received in revised form 30 January 2013

Accepted 19 February 2013

## Keywords:

Boar semen storage

AMPK

Motility

Viability

Membrane integrity

Acrosomal integrity

## ABSTRACT

Boar semen preservation for later use in artificial insemination is performed by diluting semen in an appropriate medium and then lowering the temperature to decrease spermatozoa metabolism. The adenosine monophosphate-activated kinase, AMPK, is a key cell energy sensor that controls cell metabolism and recently has been identified in boar spermatozoa. Our aim was to investigate the role of AMPK in spermatozoa functional parameters including motility, mitochondrial membrane potential, plasma membrane integrity, acrosome integrity, and cell viability during long-term boar semen storage at 17 °C in Beltsville thawing solution. Boar seminal doses were diluted in Beltsville thawing solution in the presence or absence of different concentrations of AMPK inhibitor, compound C (1, 10, and 30 μM) and evaluations were performed at 1, 2, 4, 7, or 10 days. Data demonstrate that AMPK becomes phosphorylated at threonine<sup>172</sup> (active) during storage of boar semen reaching maximum levels at Day 7. Moreover, AMPK inhibition during boar semen storage causes: (1) a potent inhibition of spermatozoa motility; (2) a reduction in the percentage of spermatozoa showing high mitochondria membrane potential; (3) a rise in the percentage of spermatozoa displaying high plasma membrane scrambling; and (4) a loss of acrosomal membrane integrity. Our study suggests that AMPK activity plays an important role in the maintenance of the spermatozoa quality during long-term storage of boar semen.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Pig production includes the development of seminal doses in liquid state, which is stored at 15 °C to 20 °C for several days until semen is used for artificial insemination (AI) [1]. To preserve spermatozoa for prolonged periods, the metabolic activity of these germ cells needs to be reduced and this is accomplished by diluting semen in an

appropriate medium and then lowering the temperature [1]. Several commercial boar semen extenders have been proposed [2], although the most widely used extender is the Beltsville thawing solution (BTS), developed by Pursel and Johnson [3] for thawing boar spermatozoa frozen in the pellet form, and later adapted for liquid storage by Johnson et al. [4]. One of the basic requirements in the development of extenders is to allow cooled spermatozoa an optimum use of energy sources present, mainly in the so-called long-term extenders designed for semen storage for more than 3 days [2]. To date, the improvement of extenders for use in swine AI with cooled semen has been approached in studies based on: (1) the evaluation of the metabolic

\* Corresponding author. Tel.: +34 927 257100 ×51327; fax: +34 927 257110.

E-mail address: [ljgarcia@unex.es](mailto:ljgarcia@unex.es) (L.J. Garcia-Marin).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally as senior investigators of this study.

substrates used by spermatozoa to obtain energy; or (2) the addition of compounds that minimize the alterations in the extender because of spermatozoa activity, such as oxidative stress, pH fluctuations, or those that protect spermatozoa from cold shock [5]. However, as far as we know, no works have been performed aimed to study kinase-orchestrated intracellular pathways that regulate spermatozoa physiology during long-term boar semen storage at 17 °C.

Recently, we have identified for the first time the presence of the adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK) in mammalian spermatozoa [6]. The AMPK is an enzyme conserved along the eukaryote kingdom that senses intracellular AMP levels and controls cell metabolism [7] and therefore could act as a key molecule in the spermatozoa adaptation to the long-term storage process. In addition to allosteric activation by AMP, phosphorylation of threonine (Thr)<sup>172</sup> in its  $\alpha$  subunit appears to be essential for AMPK activity because site-directed mutagenesis of Thr<sup>172</sup> to alanine completely abolishes kinase activity [8,9]. In energy-limiting conditions or different cellular stresses, AMPK becomes activated and phosphorylates several downstream substrates, leading to inhibition of ATP-consuming pathways (e.g., fatty acid and cholesterol synthesis) and simultaneously to activation of ATP-generating pathways (e.g., fatty acid oxidation and glycolysis) [10,11].

Because long-term semen storage at 17 °C is accompanied by intense metabolic and energetic changes in the spermatozoa, our objective was to study AMPK expression in these germ cells and its possible function in the maintenance of the quality of extended boar semen during long-term storage at 17 °C in BTS.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and sources

Beltsville thawing solution was from Minitub Iberica (Tarragona, Spain); LIVE/DEAD Sperm Viability Kit including propidium iodide (PI) and SYBR-14 probes, and merocyanine 540 (M540) and YoPro-1 probes were purchased from Molecular Probes (Leiden, The Netherlands); 6-[4-(2-Piperidin-1-ylethoxy) phenyl]-3-pyridin-4-ylpyrazolo[1,5-a]pyrimidine (compound C; CC) and FITC-PNA were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); anti-AMPK $\alpha$  antibody was from Cell Signaling (Beverly, MA, USA); anti-P-Thr<sup>172</sup>-AMPK antibody was from Santa Cruz Biotechnology (lot H0210; Santa Cruz, CA, USA); coulter isoton II diluent was purchased from Beckman Coulter, Inc. (Brea, CA, USA); 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodine (JC-1) probe, Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG, and ProLong gold antifade reagent with 4,6-diamidino-2-phenylindole hydrochloride (DAPI) were from Life Technologies Ltd. (Grand Island, NY, USA); and microscope slides coated with L-lysine were from Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA).

### 2.2. Boar semen collection and storage

Fresh ejaculate samples from 6 boars (Duroc breed, 2–4 years of age) housed at a commercial insemination station

(Tecnogenext, S.L., Mérida, Spain) were used as ejaculate donors. The boars were housed in individual pens in an environmentally controlled (15 °C–25 °C) building and received the same diet. Artificial insemination using preserved liquid semen from these boars demonstrated their fertility. Fresh ejaculates were collected with the gloved hand technique and immediately placed in a water bath at 37 °C. After collection, a computer-assisted sperm analysis (CASA) system (ISASPsus; Proiser R+D, S.L., Paterna, Valencia, Spain) was used for evaluation of sperm characteristics (sperm concentration, motility, and normal morphology). Only ejaculates with at least 80% morphologically normal spermatozoa, 70% motile spermatozoa, and a total number of spermatozoa greater than  $10 \times 10^9$  were used. Immediately after collection, five subsamples of each whole ejaculate were diluted in BTS extender, to a final concentration of  $35 \times 10^6$  cells per mL. The extended semen from each subsample was then stored in commercial seminal dose bags in a semen storage unit at 20 °C–22 °C (Climate box; IMV Technologies, Humeco, Huesca, Spain) for approximately 60 minutes for transit to the laboratory. Sperm subsamples were treated as follows: (1) addition of a widely used inhibitor of the AMPK activity in somatic cells, CC (12.5 mM stock solution in dimethyl sulfoxide) at different final concentrations of 1, 10, or 30  $\mu$ M; the CC is a cell-permeable pyrazolopyrimidine molecule that acts as a potent, selective, reversible, and ATP-competitive inhibitor of AMPK ( $K_i = 109$  nM in the presence of 5  $\mu$ M ATP and the absence of AMP); (2) addition of the highest DMSO concentration (0.24%) used to dilute CC; and (3) without any addition, untreated subsample (BTS). An aliquot of BTS subsample was analyzed for sperm quality (Day 0) before doses were stored in a refrigerated incubator (FOC 225 I; VEP Scientific, Usmate, Italy) at 17 °C for 10 days. An aliquot of each subsample was removed and analyzed for sperm quality on Days 1, 2, 4, 7, and 10.

### 2.3. Western blot analysis

Spermatozoa were centrifuged for 20 seconds at  $7000 \times g$ , washed with phosphate buffered saline (PBS) supplemented with 0.2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and then lysated in a lysis buffer consisting of 50 mM TRIS/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% deoxycholate, 1 mM ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), 0.4 mM 2-({2-[Bis(carboxymethyl)amino]ethyl} (carboxymethyl)amino)acetic acid (EDTA), protease inhibitor cocktail (Complete; EDTA-free), and 0.2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, followed by sonication for 5 seconds at 4 °C. After 20 minutes at 4 °C, samples were centrifuged at  $10,000 \times g$  (15 minutes, 4 °C) and the supernatant (lysate) was collected for AMPK and phospho-AMPK analysis after evaluation of protein concentration using a BioRad protein assay reagent. Proteins from porcine spermatozoa lysates were resolved using 10% SDS-PAGE and electro-transferred to nitrocellulose membranes. Western blot analysis was performed as previously described in these germ cells [6] using anti-AMPK $\alpha$  (1:1000), anti-phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK $\alpha$  (1:500), and anti-glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (1:2000) polyclonal antibodies as primary antibodies.

#### 2.4. Immunolocalization of AMPK $\alpha$ in boar spermatozoa using immunofluorescence

Aliquots of 40  $\mu$ L of sperm samples were fixed with 4% paraformaldehyde for 4 minutes and then spread onto poly-L-lysine coated microscope slides and were then left to air-dry. After three washings (5 minutes in PBS), sperm samples were permeabilized by incubation for 10 minutes at room temperature (RT) in PBS, pH 7.4, containing 0.25% (vol/vol) Triton X-100. Then, samples were washed three times with PBS and blocked by incubation with PBS including 0.1% (vol/vol) Tween-20 and 1% (wt/vol) BSA for 30 minutes at RT. Incubation with the primary antibody, AMPK $\alpha$  (1:100) diluted in blocking buffer was carried out overnight at 4 °C. After the binding of specific antibody, samples were washed thoroughly with PBS and incubated with Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1:200) for 60 minutes at RT. As negative controls, samples incubated with primary serum and without secondary antibody were run in parallel. Slides were gently washed with PBS and then incubated with 5  $\mu$ L of a commercial solution of DAPI 125 ng/mL as a nuclear stain and an antifading mounting solution. Any excess of liquid was eliminated and coverslips were finally sealed with colorless nail polish and stored at 4 °C in the dark until microscope observation. Fluorescent images were obtained using confocal laser scanning fluorescence microscopy (Fluoview FV1000; Olympus, Tokyo, Japan) and images were captured with the software Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF) (Leica Microsystems, S.L.U., Barcelona, Spain). The images were processed using Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA).

#### 2.5. Evaluation of spermatozoa motility using a CASA (ISAS, v1.2; Proiser R+D) system

Immediately after gentle mixing, 1 mL of stored semen was taken from each bottle and examined for motility pattern using a CASA system (ISAS program, v1.2; Proiser R+D). In previous motility analyses, seminal doses were incubated with 5% CO<sub>2</sub> at 38.5 °C during 30 minutes (Mini Galaxy A; RS Biotech). A total of 2  $\mu$ L of sample was placed in a prewarmed counting chamber (Leja; Luzernestraat, The Netherlands). Sperm motility analysis is based on the examination of 25 consecutive digitalized images obtained from several fields using a 10 $\times$  negative-phase contrast objective, and at least 300 spermatozoa per sample were analyzed. Images were taken with a time-lapse of 1 second. The number of objects incorrectly identified as spermatozoa was minimized by adjusting the particle size analysis, the minimum number of images per second (11) to analyze the trajectory, and the connectivity value. All of them are selectable features in the ISAS program, v1.2 (Proiser R+D). In addition, the fields analyzed were reassessed to remove impossible trajectories and analyzed particles that did not correspond with sperm.

After acquiring five representative fields in a random distribution, the following sperm motility parameters were recorded: total motile spermatozoa (percentage of spermatozoa with an average path velocity >10  $\mu$ m/s), progressively motile spermatozoa (percentage of spermatozoa

with a straightness coefficient >80%), curvilinear velocity (VCL;  $\mu$ m/s), straight-line velocity ( $\mu$ m/s), average path velocity ( $\mu$ m/s), linearity coefficient (LIN; %), straightness coefficient (%), wobble coefficient (%), and amplitude of lateral head displacement ( $\mu$ m). For porcine spermatozoa the definition used for hyperactivated motility was spermatozoa with VCL  $\geq$ 95  $\mu$ m/s, LIN  $\leq$ 30%, amplitude of lateral head displacement >3.5  $\mu$ m, and wobble coefficient  $\leq$ 70% [12].

#### 2.6. Flow cytometry analyses

Flow cytometry analyses were performed using a Coulter EPICS XL-MCL flow cytometer (Beckman Coulter, Inc.). The fluorophores were excited by a 200-mV argon ion laser operating at 488 nm. A total of 10,000 gated events based on the forward scatter and side scatter of the sperm population recorded in the linear model were collected per sample to a running rate of approximately 500 events per second. Fluorescence data were collected in the logarithmic mode and analyzed using a FACStation and EXPO 32 ADC software (Beckman Coulter, Inc.).

#### 2.7. Analysis of spermatozoa viability using flow cytometry

As described previously [13] fluorescent staining using the LIVE/DEAD Sperm Viability Kit Sperm Viability Kit (Molecular Probes) was performed to assess porcine spermatozoa viability. Briefly, 5  $\mu$ L of SYBR-14 (2  $\mu$ M) and 10  $\mu$ L of PI (5  $\mu$ M) were added to 500  $\mu$ L of diluted semen sample in isotonic buffered diluent Coulter Isoton II and incubated for 20 minutes at room temperature in the darkness. After incubation, cells were analyzed using flow cytometry and the percentage of viable spermatozoa was expressed as the average of the percentage of SYBR14-positive and PI-negative spermatozoa.

#### 2.8. Evaluation of the spermatozoa plasma membrane integrity

Spermatozoa plasma membrane integrity was assessed by staining with M540 and plasma membrane permeability by staining with YoPro-1. Aliquots of 100  $\mu$ L of each semen sample (35  $\times$  10<sup>6</sup> cells per mL) were diluted in 400  $\mu$ L of isotonic buffered diluent containing 75 nmol/L YoPro-1, which were then mixed and incubated at 38 °C for 15 minutes. Just before analysis, M540 was added to each sample to a final concentration of 2  $\mu$ mol/L, incubated for 2 minutes and remixed before flow cytometry analysis. Labeled spermatozoa were categorized as: (1) viable cells with low plasma membrane scrambling (YoPro-1<sup>-</sup>/M540); (2) viable cells with high plasma membrane scrambling (YoPro-1<sup>-</sup>/M540<sup>+</sup>); or (3) nonviable cells with altered permeability (YoPro-1<sup>+</sup>). The percentage of viable cells with high plasma membrane scrambling was expressed as the average percentage.

#### 2.9. Evaluation of the integrity of acrosomes in boar spermatozoa using flow cytometry

The acrosomal status of spermatozoa was assessed after staining the spermatozoa with phycoerythrin, as a marker

for acrosome status, and PI. Aliquots of 100  $\mu\text{L}$  of each semen sample ( $35 \times 10^6$  cells per mL) were incubated at room temperature in the dark for 5 minutes with 1  $\mu\text{g}$  per mL phycoerythrin and 6  $\mu\text{mol/L}$  PI. Just before analysis, 400  $\mu\text{L}$  of isotonic buffered diluent was added to each sample and remixed before flow cytometry analysis. Cells were analyzed and the percentage of spermatozoa with acrosomes damaged or reacted is expressed as the average percentage of phycoerythrin-positive and PI-negative stained spermatozoa.

### 2.10. Analysis of mitochondrial membrane potential using flow cytometry

Mitochondrial membrane potential variations were evaluated using the specific probe JC-1. This lipophilic cationic fluorochrome is present as protomeric aggregates in mitochondria with high membrane potential that emit in orange (590 nm), whereas in mitochondria with low membrane potential, JC-1 is present as monomers that emit in green (525 nm) when excited at 488 nm. From each sperm sample, 100  $\mu\text{L}$  ( $35 \times 10^6$  cells per mL) were diluted in 400  $\mu\text{L}$  of isotonic buffered diluent containing 0.15 mmol/L JC-1 and then mixed and incubated at 38 °C for 30 minutes. The samples were remixed before flow cytometry analysis. The percentage of orange-stained cells, which represents the population of germ cells with high mitochondrial membrane potential (hMMP), was recorded and expressed as the average of 12 experiments.

### 2.11. Statistical analysis

A power analysis was conducted to determine the appropriate number of animals and samples. The mean and standard deviation of the mean were calculated for descriptive analysis. Q-Q plots were used to check for departures from the normal distribution. All the sperm variables satisfied the normality requirement for a parametric analysis of variance.

The effects of treatment (untreated and Compound-C) and storage time (1, 4, 7, and 10 days) on several seminal characteristics (motility, viability, membrane fluidity, and acrosomal and mitochondrial membrane status of spermatozoa) were analyzed statistically using a general linear

model. A mixed-effects model (with boars and ejaculates within boars as random effects and treatment and storage time as fixed effects) was applied to the experimental design. The Bonferroni test was used to perform post hoc tests. The Pearson parametric test was used to study the correlation among the percentage of spermatozoa with high mitochondrial membrane potential and the intensity of phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK obtained. All analyses were performed using SPSS v15.0 for Windows software (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). The level of significance was set at  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Effect of long-term semen storage in BTS at 17 °C on boar spermatozoa viability, mitochondrial membrane potential, plasma membrane organization, and acrosome integrity

Long-term boar semen storage at 17 °C leads to a statistically significant increase in the percentage of boar spermatozoa with high M540 fluorescence ( $9.8\% \pm 1.3\%$  at Day 0 and increasing to  $25.4\% \pm 4.8\%$  at Day 10), which is indicative of a higher degree of plasma membrane scrambling with increasing semen storage time (Table 1). In parallel, storage of boar semen causes a slight time-dependent increase in the percentage of spermatozoa showing damaged or reacted acrosomes, reaching maximum levels of compromised acrosome integrity at Day 10 (Table 1), although this increase was not statistically different compared with Day 0. Regarding the effect of long-term storage on boar spermatozoa viability, the percentage of viable germ cells with an intact plasma membrane is maintained until Day 7 (Table 1), which confirms our previous results in this specie [14]. However, a small but significant decrease in the percentage of viable spermatozoa occurs at Day 10 of storage (Table 1). The first 2 days of semen storage cause a significant increase in the percentage of spermatozoa showing high mitochondrial membrane potential, then decline gradually over time reaching at Day 10 values similar to values at Day 0 (Table 1). The possible effect of solvent DMSO (0.24%) in these spermatozoa parameters was analyzed in parallel samples. Beltsville thawing solution including 0.24% DMSO does not affect spermatozoa viability, mitochondrial membrane potential, plasma membrane scrambling, or the integrity of the

**Table 1**

Effect of long-term semen storage in BTS at 17 °C on boar spermatozoa viability, mitochondrial membrane potential, membrane integrity, and acrosome integrity.

Storage	Cell viability (%)		High mitochondrial membrane potential (%)		Plasma membrane integrity (%)		Acrosome damaged (%)	
	BTS	DMSO	BTS	DMSO	BTS	DMSO	BTS	DMSO
Day 0	92.9 $\pm$ 0.3		66.5 $\pm$ 3.3		9.8 $\pm$ 1.3		6.4 $\pm$ 1.0	
Day 1	90.9 $\pm$ 0.9	91.7 $\pm$ 0.5	80.9 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	75.9 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	10.0 $\pm$ 1.2	10.5 $\pm$ 1.3	6.5 $\pm$ 1.1	6.9 $\pm$ 1.0
Day 2	91.0 $\pm$ 0.8	91.2 $\pm$ 0.5	78.7 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	76.2 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	10.4 $\pm$ 1.2	10.5 $\pm$ 1.0	6.3 $\pm$ 0.9	6.6 $\pm$ 1.0
Day 4	89.5 $\pm$ 1.2	91.1 $\pm$ 0.7	75.8 $\pm$ 2.9	72.6 $\pm$ 4.3	12.0 $\pm$ 1.0	11.7 $\pm$ 1.4	6.9 $\pm$ 0.8	7.1 $\pm$ 1.0
Day 7	88.8 $\pm$ 1.2	90.1 $\pm$ 4.0	70.1 $\pm$ 4.9	65.3 $\pm$ 2.9	16.5 $\pm$ 2.0	15.6 $\pm$ 1.8	7.9 $\pm$ 1.0	7.5 $\pm$ 0.9
Day 10	85.0 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	82.9 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	67.7 $\pm$ 3.8	65.4 $\pm$ 5.0	25.4 $\pm$ 4.8 <sup>a</sup>	24.6 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	9.3 $\pm$ 1.4	9.6 $\pm$ 1.4

Boar seminal doses were preserved at 17 °C during 10 days in BTS in presence or absence of DMSO (0.24%). Percentages of cell viability, high mitochondrial membrane potential, plasma membrane integrity, and acrosomal integrity of spermatozoa were measured using flow cytometry as described in section 2. Materials and methods. Results are mean  $\pm$  SEM (N = 12).

Abbreviation: BTS, Beltsville thawing solution.

<sup>a</sup> Within a column, statistically different from Day 0 ( $P < 0.05$ ).

**Table 2**  
Effect of long-term semen storage in BTS at 17 °C on boar spermatozoa motility parameters.

Storage	Motile (%)		Progressive motility (%)		VCL (µm/s)		VAP (µm/s)		Linearity coefficient (%)		Hyperactivated motility (%)	
	BTS	DMSO	BTS	DMSO	BTS	DMSO	BTS	DMSO	BTS	DMSO	BTS	DMSO
Day 0	81.7 ± 2.1		41.7 ± 6.0		77.8 ± 4.1		60.8 ± 2.2		54.6 ± 4.0		6.8 ± 2.6	
Day 1	73.6 ± 3.0	66.4 ± 4.4	37.1 ± 5.2	38.5 ± 5.7	79.3 ± 4.1	75.8 ± 2.5	59.7 ± 3.0	55.8 ± 2.8	49.9 ± 3.2	50.8 ± 3.17	7.8 ± 2.6	8.7 ± 2.2
Day 2	69.7 ± 4.1	68.8 ± 3.6	41.4 ± 4.8	42.3 ± 4.9	76.6 ± 3.6	76.6 ± 2.5	57.5 ± 2.7	57.0 ± 3.0	52.0 ± 3.2	52.6 ± 3.5	8.1 ± 2.1	8.3 ± 2.8
Day 4	73.6 ± 5.0	69.9 ± 4.0	49.7 ± 5.2	50.5 ± 4.9	79.0 ± 3.3	76.5 ± 2.9	61.5 ± 2.5	58.7 ± 3.0	57.6 ± 3.2	57.9 ± 3.04	6.1 ± 2.7	6.8 ± 1.9
Day 7	63.6 ± 6.1 <sup>a</sup>	68.2 ± 2.7 <sup>a</sup>	51.6 ± 3.3	54.4 ± 4.6	70.9 ± 4.1	73.7 ± 2.9	53.2 ± 3.7	56.3 ± 2.9	57.0 ± 1.9	58.6 ± 2.7	4.6 ± 1.6	5.4 ± 1.2
Day 10	55.9 ± 7.1 <sup>a</sup>	59.4 ± 4.6 <sup>a</sup>	45.8 ± 2.9	54.5 ± 4.8	78.0 ± 3.8	77.1 ± 3.3	55.7 ± 3.8	54.8 ± 3.8	52.2 ± 2.3	55.1 ± 3.1	6.8 ± 0.7	7.1 ± 1.2

Boar seminal doses were preserved at 17 °C during 10 days in BTS in presence or absence of DMSO (0.24%). Spermatozoa motility parameters were measured using the computer-assisted sperm analysis (ISAS, v1.2) system as described in section 2. Materials and methods. Results are mean ± SEM (SEM) (n = 12).

Abbreviations: BTS, Beltsville thawing solution; VAP, average path velocity; VCL, curvilinear velocity.

<sup>a</sup> Within a column, statistically different from Day 0 (P < 0.05).

acrosome during semen storage at 17 °C for 10 days compared with semen stored in BTS alone (Table 1).

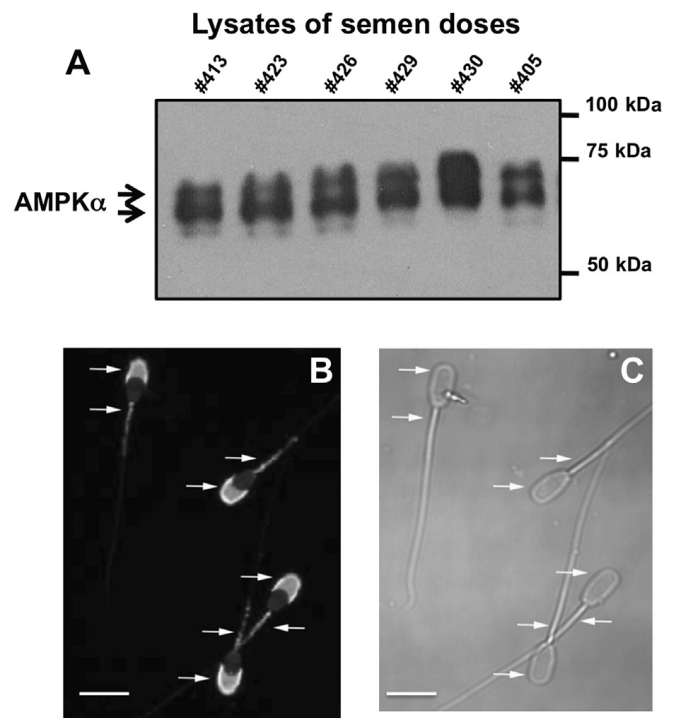
### 3.2. Effect of long-term semen storage in BTS at 17 °C on boar spermatozoa motility

Storage of semen in BTS at 17 °C causes a statistically significant decrease in the percentage of motile spermatozoa starting from Day 7, without any significant effect in other motility parameters analyzed (Table 2). The solvent DMSO (0.24%) does not significantly modify any spermatozoa motility parameters evaluated during semen storage (Table 2).

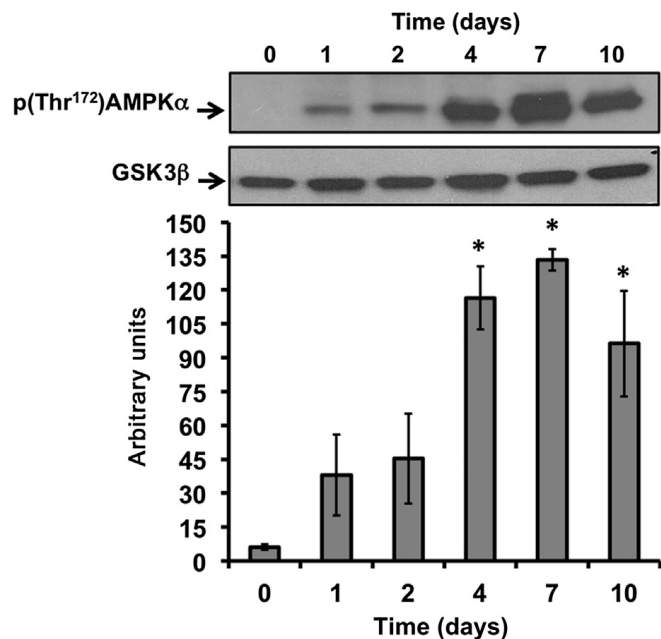
### 3.3. Identification and localization of AMPK in fresh boar ejaculates

Two cross-reactive bands are detected in spermatozoa lysates from fresh ejaculates of six different boars at the correct molecular weight of the α subunit of AMPK (Fig. 1A).

The expression of AMPK protein was investigated with indirect immunofluorescence in boar spermatozoa using the same antibody against the catalytic α subunit of AMPK. Results demonstrate that AMPK protein is highly expressed



**Fig. 1.** Identification and immunolocalization of adenosine monophosphate-activated kinase (AMPK), in boar spermatozoa. (A) Spermatozoa isolated from fresh ejaculates of different boars (numbered) were lysed, subjected to SDS-PAGE, electrotransferred to nitrocellulose, and Western blot analysis was performed using anti-AMPKα as a primary antibody as described in section 2. Materials and methods. The antibody against AMPKα recognized two bands close to 64 kDa. Molecular weight markers are indicated at the right side. A representative film including ejaculates from six boars is shown (N = 12). (B) and (C) Fresh spermatozoa from different boars were pooled and fixed in 4% paraformaldehyde and immunostaining was performed using antibody against the catalytic subunit of AMPKα. The immunofluorescence was visualized in a confocal microscope and a representative image is shown in (B), and Normaski optic visualization is shown in (C). Arrows show AMPKα immunolocalization. Scale bars, 10 µm.



**Fig. 2.** Phosphorylation of adenosine monophosphate-activated kinase (AMPK) at threonine (Thr)<sup>172</sup> in spermatozoa from extended boar semen during long-term storage at 17 °C. Boar semen was stored in Beltsville thawing solution at 17 °C for 10 days. At the indicated time spermatozoa were lysed and proteins (20 µg) from lysates were analyzed using Western blot with anti-phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPKα (p(Thr<sup>172</sup>)-AMPKα) as the primary antibody, as described in section 2. Materials and methods. The arrow indicates the cross-reactive band of p(Thr<sup>172</sup>)-AMPKα, recognized by the anti-AMPKα (upper film). Loading controls were performed for each experiment in the same membranes (with different time of chemiluminescence exposure) using anti-glycogen synthase kinase (GSK)3β antibody (lower film). This image is representative of another six performed in duplicate. The bottom panel shows the quantification of the intensity of p(Thr<sup>172</sup>)-AMPKα obtained in each sample. Values are the mean ± SEM (N = 12) expressed as relative arbitrary units after scanning the films. \* Significant differences when compared with Day 0 (P < 0.05).

in boar spermatozoa stored at 17 °C in BTS and is mainly localized at the entire acrosome of the spermatozoa head and in the midpiece of the flagellum, as seen in Figure 1B.

### 3.4. Spermatozoa AMPK becomes highly phosphorylated at Thr<sup>172</sup> (active) during boar semen storage at 17 °C in BTS

As shown in Figure 2, one cross-reactive band is detected at the correct molecular weight with anti-phospho-

Thr<sup>172</sup>-AMPKα antibody. Our results show that in fresh boar ejaculates (Day 0) phosphorylation of AMPK is not detected, which indicates that in these conditions most of the AMPK is not active. However, just 1 day of storage clearly leads to the threonine phosphorylation (activation) of AMPK which is further and significantly enhanced during long-term storage at 17 °C in BTS in a time-dependent manner, reaching maximum levels at Day 7 of storage (Fig. 2). A loading control of protein is shown in lower panel of Figure 2 using an anti-glycogen synthase kinase 3β antibody; we have previously shown that amount of this protein in boar spermatozoa does not change in our experimental conditions [15]. Taken together, the data from the percentage of spermatozoa showing hMMP (Table 1) and the measurement of phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPKα (Fig. 2), we were able to demonstrate a statistically significant negative correlation between both parameters (r = -0.542; P < 0.003).

### 3.5. Effects of the AMPK inhibitor, CC, on the viability and the mitochondrial membrane potential of spermatozoa during long-term boar semen storage at 17 °C in BTS

In boar spermatozoa, we have confirmed that CC (30 µM) effectively blocks the phosphorylation (activation) of AMPK that occurs in spermatozoa physiological conditions without any side effect in these germ cells [6].

The storage of boar semen at 17 °C during the long-term in the presence of different concentrations of CC (1, 10, and 30 µM) does not affect the percentage of viable spermatozoa with an intact plasma membrane, when compared with BTS alone (Table 3). However, the presence of the highest concentration used (30 µM CC) causes a significant decrease in the percentage of spermatozoa displaying high mitochondrial membrane potential starting at 7 days of semen storage (Table 3).

### 3.6. Effects of the AMPK inhibitor on the lipid organization of spermatozoa plasma membrane and in the acrosomal integrity during boar semen storage at 17 °C in BTS

Our results shows that AMPK inhibitor (CC 30 µM) causes a significant increase in the percentage of spermatozoa showing greater disorganization of plasma membrane after 4 days of semen storage (Fig. 3A), reaching maximum values of 62.6% ± 7.1% at Day 10 (Fig. 3A). This

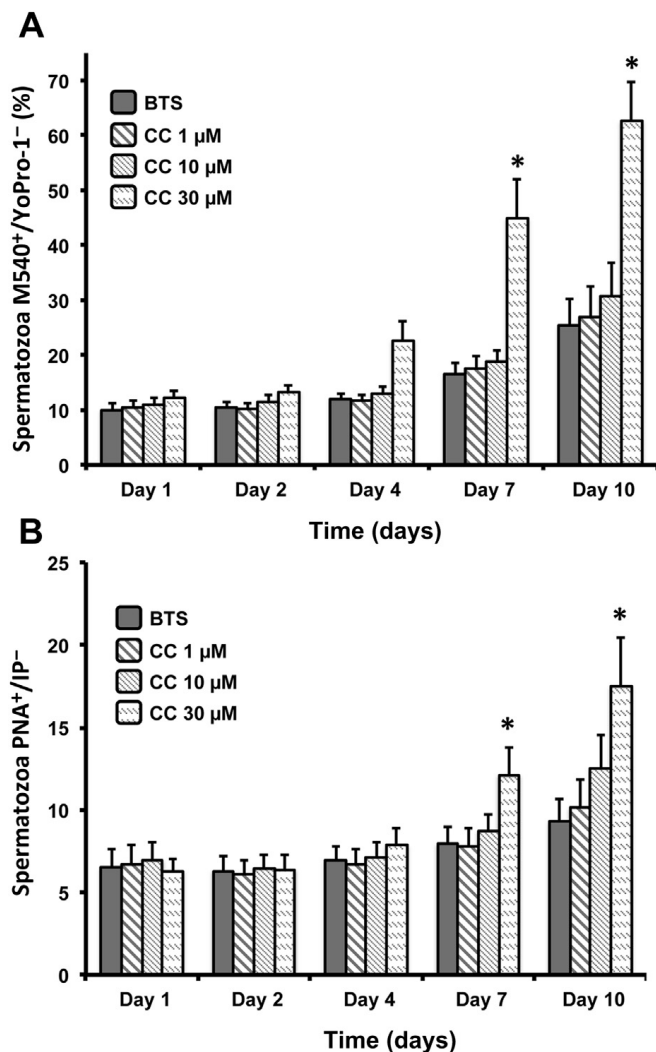
**Table 3**  
Effect of the AMPK inhibitor CC on boar spermatozoa viability and mitochondrial membrane potential during long-term semen storage in BTS at 17 °C.

Storage	Cell viability (%)				High mitochondrial membrane potential (%)			
	BTS	CC 1 µM	CC 10 µM	CC 30 µM	BTS	CC 1 µM	CC 10 µM	CC 30 µM
Day 0	92.94 ± 0.33				66.57 ± 3.35			
Day 1	90.86 ± 0.88	92.28 ± 0.50	91.23 ± 0.50	86.98 ± 0.82	80.93 ± 1.97	78.11 ± 1.89	79.33 ± 1.68	77.05 ± 2.20
Day 2	91.05 ± 0.78	92.30 ± 0.59	91.41 ± 0.71	87.41 ± 1.03	78.72 ± 1.77	76.43 ± 1.95	77.46 ± 4.64	74.84 ± 1.69
Day 4	89.53 ± 1.16	91.87 ± 0.42	90.33 ± 0.78	86.14 ± 0.83	75.77 ± 2.98	72.41 ± 2.47	76.19 ± 1.90	77.05 ± 1.41
Day 7	88.81 ± 1.24	89.83 ± 0.63	88.40 ± 0.78	84.91 ± 0.61	70.11 ± 4.96	68.89 ± 2.21	67.86 ± 2.15	59.32 ± 5.17 <sup>a</sup>
Day 10	85.03 ± 1.80	79.89 ± 4.58	84.11 ± 2.25	80.87 ± 1.61	67.68 ± 3.84	64.93 ± 5.57	67.05 ± 3.54	57.76 ± 5.60 <sup>a</sup>

Boar seminal doses were preserved at 17 °C during 10 days in BTS in presence or absence of different concentrations of CC (1, 10, and 30 µM). Percentages regarding germ cells viability and spermatozoa with high ΔΨ mitochondrial were measured using flow cytometry as described in section 2. Materials and methods. Results are expressed as mean ± SEM (N = 12).

Abbreviations: AMPK, adenosine monophosphate-activated kinase; BTS, Beltsville thawing solution; CC, compound C.

<sup>a</sup> Within a row, values are statistically different from BTS alone (P < 0.05).



**Fig. 3.** Effect of spermatozoa adenosine monophosphate-activated kinase (AMPK) inhibition with different concentrations of compound C (CC) in the plasma membrane scrambling and acrosome reaction in extended boar semen during long-term storage at 17 °C. Boar semen was stored at 17 °C during 10 days in Beltsville thawing solution (BTS) in presence or absence of the AMPK inhibitor CC (1, 10, and 30 μM). (A) The level of lipid disorganization of spermatozoa plasma membrane was measured using flow cytometry as described in section 2. Materials and methods, using merocyanine (M540) as a probe. The spermatozoa population exhibiting plasma membrane scrambling (M540<sup>+</sup>) is expressed as percentage of the total live spermatozoa (YoPro-1<sup>-</sup>). Results are expressed as the mean ± SEM (N = 12). \* Statistically different from control (BTS) value (P < 0.05). (B) Acrosomal integrity was measured using flow cytometry as described in section 2. Materials and methods using phycoerythrin as a probe. Spermatozoa population PNA<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> is expressed as percentage of total spermatozoa. Results are expressed as the mean ± SEM (N = 12). \* Statistically different from control values in samples stored in BTS alone (P < 0.05).

CC-induced rise in the percentage of spermatozoa showing higher plasma membrane scrambling is accompanied by a statistically significant increase in the percentage of spermatozoa presenting altered acrosomal membranes at Days 7 and 10 of semen storage in the presence of CC (30 μM) (Fig. 3B).

### 3.7. Effect of AMPK inhibition in spermatozoa motility during boar semen storage at 17 °C in BTS

To evaluate the effect of the AMPK inhibition in spermatozoa motility parameters during semen storage, boar

seminal doses were diluted in BTS in the presence or absence of different concentrations of CC (1, 10, and 30 μM). After 1, 2, 4, 7, or 10 days of storage at 17 °C, seminal doses were incubated with 5% CO<sub>2</sub> at 38.5 °C during 30 minutes to ensure motility and then motility parameters were evaluated.

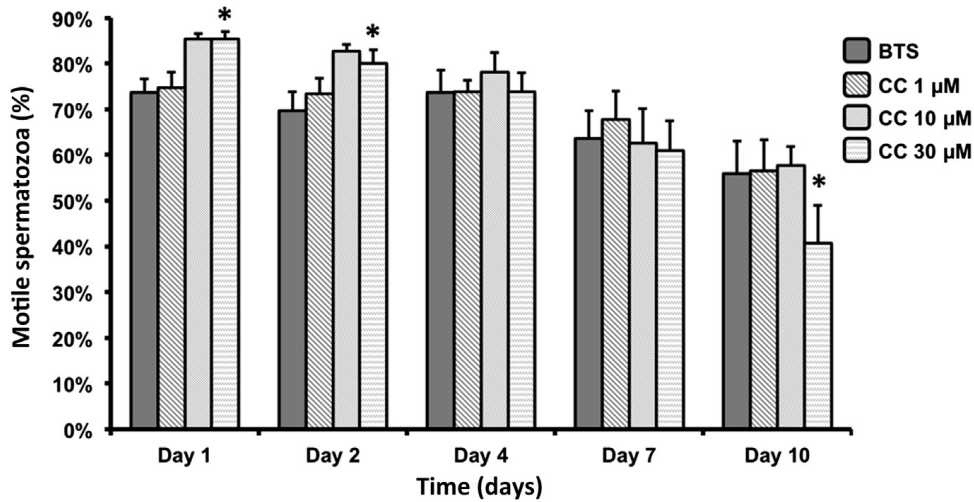
In the short-term of semen storage (1–2 days), inhibition of AMPK with CC causes a slight but statistically significant increase in the percentage of motile spermatozoa (Fig. 4), without affecting the VCL (Fig. 5). Moreover, during these 2 days of storage the inhibition of AMPK leads to a significant increase in the LIN of spermatozoa movement, and in the percentage of spermatozoa showing progressive movement. At the same time, CC treatment (30 μM) causes a clear and statistically significant decrease in the percentage of spermatozoa showing hyperactivated motility (Table 4).

In the long-term, after 4 days of semen storage, inhibition of AMPK with different concentrations of CC (1, 10, and 30 μM) causes a clear and significant decrease in any spermatozoa velocity analyzed; VCL (Fig. 5), average path velocity, and straight-line velocity (data not shown). In addition, treatment with 30 μM CC caused a reduction in the percentage of motile spermatozoa at Day 10 of semen storage (Fig. 4), accompanied by a recovery to initial levels (Day 0) of the values of LIN coefficient, percentage of spermatozoa with progressive movement, and percentage of spermatozoa having hyperactivated motility (Table 4).

## 4. Discussion

Long-term storage of boar ejaculates produces a gradual loss of the ability of spermatozoa to fertilize when preserved semen doses are later used in artificial insemination, especially if the fertility potential of semen samples fall below a certain threshold level [16]. During storage at 15 °C to 17 °C, boar spermatozoa undergo several changes, including among others: decreased motility [17], increase in the proportions of prematurely capacitated-like and acrosome damaged spermatozoa [18–20], and decrease in ATP concentration [21]. Previous studies have demonstrated that preservation of boar spermatozoa for prolonged periods requires a decrease in their metabolic activity, which is carried out by lowering the temperature to 15 °C to 17 °C and diluting in an appropriate medium [1,2]. The control of cell metabolism in spermatozoa is achieved by dynamic mechanisms able to adapt to environmental changes and related with cellular structures such as mitochondria or plasmalemma [22]. Therefore, regulation of the energy levels is of essential importance in the understanding of spermatozoa function during long-term storage at 17 °C. In mammalian tissues, the protein AMPK controls metabolism [23,24] by activating metabolic pathways that produce ATP and simultaneously by inhibiting pathways that consume ATP [25,26].

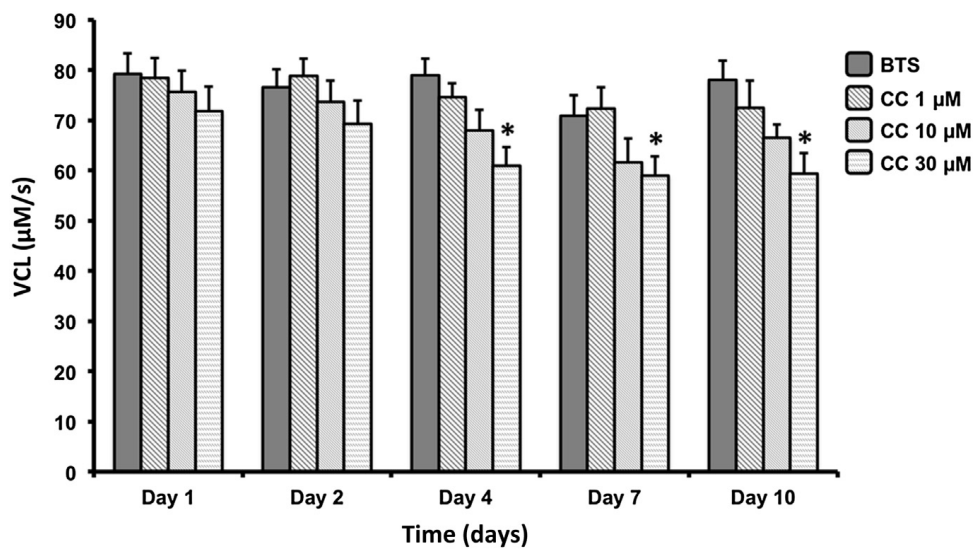
In a recent work, we have shown for the first time that the metabolic sensor AMPK is expressed in spermatozoa and that AMPK phosphorylation (activation) is dependent on the temperature [6]. Moreover, the present study shows that the metabolic sensor kinase AMPK is localized at the entire acrosome at a relatively high level and in the



**Fig. 4.** Effect of adenosine monophosphate-activated kinase (AMPK) inhibition with different concentrations of compound C (CC) in the percentage of motile spermatozoa from extended boar semen during long-term storage at 17 °C. Boar semen was stored at 17 °C during 10 days in Beltsville thawing solution (BTS) in the presence or absence of the AMPK inhibitor CC (1, 10, and 30 μM). The percentage of motile spermatozoa was measured using the CASA (ISAS, v1.2) system as described in section 2. Materials and methods. Results are mean ± SEM (N = 12). \* Statistically different from control values in samples stored in BTS alone (P < 0.05).

midpiece of flagellum in boar spermatozoa stored at 17 °C in BTS. Furthermore, our results demonstrate that AMPK becomes phosphorylated at Thr<sup>172</sup>, and therefore subsequently activated, during boar semen storage at 17 °C in BTS. The phosphorylation level of AMPK varies with the time of storage with more than a 10-fold increase after 4 days and a maximum level at 7 days. This increase in the Thr<sup>172</sup>-AMPK phosphorylation shows a statistically significant negative correlation with the percentage of spermatozoa with hMMP and might be the consequence of a fall in ATP concentration during boar semen storage at 17 °C, as demonstrated by Gogol et al. [21]. In fact, the fall in ATP content is accentuated after 4 days of storage [21], which is

parallel to the marked increase in AMPK activity and the decrease in the percentage of spermatozoa with hMMP observed in our work. Thus, we can expect that a decrease in the mitochondrial membrane potential with a fall in the spermatozoa concentration of ATP led to spermatozoa AMPK activation and the consequent activation of the metabolic pathways that produce ATP and simultaneous inhibition of pathways that consume ATP. Our results point to a possible role of AMPK activity in the maintenance of the spermatozoa mitochondrial membrane potential and the subsequent ATP production during long-term storage of boar spermatozoa at 17 °C in BTS for several reasons: (1) there is a significant negative correlation between AMPK



**Fig. 5.** Effect of adenosine monophosphate-activated kinase (AMPK) inhibition with different concentrations of compound C (CC) in the curvilinear velocity of spermatozoa (VCL) from extended boar semen during long-term storage at 17 °C. Boar semen was stored at 17 °C during 10 days in Beltsville thawing solution (BTS) in the presence or absence of the AMPK inhibitor CC (1, 10, and 30 μM). Curvilinear spermatozoa velocity was measured using the computer-assisted sperm analysis (ISAS, v1.2) system as described in section 2. Materials and methods. Results are mean ± SEM (N = 12). \* Statistically different from control values in samples stored in BTS alone (P < 0.05).



**Table 4**  
Effect of the AMPK inhibitor CC on spermatozoa progressive motility during long-term boar semen storage in BTS at 17 °C.

Storage	Linearity coefficient (%)		Progressive motility spermatozoa (%)					Hyperactivated motility (%)					
	BTS	54.6 ± 4.0	CC 1 μM	CC 10 μM	CC 30 μM	BTS	CC 1 μM	CC 10 μM	CC 30 μM	BTS	CC 1 μM	CC 10 μM	CC 30 μM
Day 0						41.7 ± 6.0				6.8 ± 2.6			
Treatment													
Day 1	49.9 ± 3.2 <sup>a</sup>	50.4 ± 2.7 <sup>a</sup>	58.1 ± 2.7 <sup>a</sup>	58.1 ± 2.7 <sup>a</sup>	65.8 ± 2.5 <sup>b</sup>	37.1 ± 5.2 <sup>a</sup>	36.9 ± 4.1 <sup>a</sup>	47.9 ± 4.6 <sup>a</sup>	61.9 ± 4.1 <sup>b</sup>	7.8 ± 2.6 <sup>a</sup>	7.6 ± 1.9 <sup>a</sup>	4.3 ± 1.1 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.7 <sup>b</sup>
Day 2	52.0 ± 3.2 <sup>a</sup>	50.9 ± 3.1 <sup>a</sup>	59.1 ± 2.8 <sup>a</sup>	59.1 ± 2.8 <sup>a</sup>	65.8 ± 2.5 <sup>b</sup>	41.4 ± 4.8 <sup>a</sup>	38.7 ± 4.7 <sup>a</sup>	49.5 ± 4.7 <sup>a</sup>	62.5 ± 4.2 <sup>b</sup>	8.1 ± 2.1 <sup>a</sup>	9.3 ± 2.6 <sup>a</sup>	4.2 ± 1.0 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.7 <sup>b</sup>
Day 4	57.6 ± 3.2	58.0 ± 2.4	62.3 ± 3.3	62.3 ± 3.3	66.3 ± 2.2	49.7 ± 5.2 <sup>a</sup>	50.7 ± 4.0 <sup>a</sup>	59.0 ± 7.1 <sup>a</sup>	67.7 ± 3.0 <sup>b</sup>	6.1 ± 2.7	5.7 ± 1.2	4.4 ± 1.3	2.4 ± 0.6
Day 7	57.0 ± 1.9	56.7 ± 2.4	59.3 ± 2.4	59.3 ± 2.4	56.3 ± 3.1	51.6 ± 3.3	49.7 ± 3.5	56.0 ± 3.9	59.4 ± 4.3	4.6 ± 1.6	5.3 ± 0.6	3.6 ± 0.7	4.1 ± 1.0
Day 10	52.2 ± 2.3	56.1 ± 1.8	55.4 ± 1.9	55.4 ± 1.9	46.7 ± 3.4	45.8 ± 2.9	54.4 ± 2.9	56.0 ± 3.0	44.7 ± 7.6	6.8 ± 0.7	6.1 ± 1.1	4.9 ± 0.6	7.3 ± 1.4 <sup>2</sup>

Boar seminal doses were preserved at 17 °C during 10 days in BTS in presence or absence of CC (1, 10, and 30 μM). Linearity coefficient and percentage of spermatozoa presenting progressive motility and hyperactivated motility spermatozoa were measured using the computer-assisted sperm analysis (ISAS, v1.2) system as described in section 2. Materials and methods. Results are mean ± SEM (N = 12).  
Abbreviations: AMPK, adenosine monophosphate-activated kinase; BTS, Beltsville thawing solution; CC, compound C.  
<sup>a,b</sup> Within a row, values with different superscript letters are statistically different from control value (BTS, P < 0.05).

activation and the percentage of spermatozoa presenting hMMP; (2) AMPK inhibition by CC treatment leads to a statistically significant decrease in the percentage of spermatozoa presenting hMMP; (3) the cellular localization of AMPK, which is found in the midpiece of the spermatozoa flagellum, where mitochondria are localized and helically arranged; (4) the higher increase in active phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK is parallel to the decrease in the ATP concentration observed in boar spermatozoa stored at 17 °C [21]; and, finally, (5) in the case that a fall in the mitochondrial membrane potential might occur during the process of boar spermatozoa death, as it has been previously shown in human spermatozoa [27], then, it could be an explanation for the fall in viability of spermatozoa when AMPK is inhibited by treatment with CC during long-term storage.

As it has been described previously [14,17], our results show that storage of extended boar semen for a long time causes a clear reduction of the percentage of motile spermatozoa. Recently, we have shown that AMPK activity is necessary for optimal boar spermatozoa motility under physiological conditions [6], which is in agreement with our results obtained in extended boar semen during long-term storage at 17 °C, showing a significant decrease of spermatozoa velocities and a reduction in the percentage of motile spermatozoa after 10-day storage. Considering the energy-regulating role of AMPK in somatic cells, we could assume that AMPK activity might play a role in spermatozoa functions that are particularly dependent on the energy levels, such as speed. Thus, because AMPK plays a central role in the maintenance of cell energy levels by regulating among other pathways the glycolysis [28], it is reasonable to assume that the decrease in the percentage of spermatozoa presenting high mitochondrial membrane potential after AMPK inhibition could additionally account for the inhibition of spermatozoa speed and, in the long-term, percentage of motile spermatozoa in extended boar semen during long-term storage at 17 °C. However, we cannot exclude a possible nonmetabolic effect of the AMPK pathway that could be involved in the control of spermatozoa motility in a parallel or synergistic way, because AMPK is a serine/threonine kinase with several known downstream substrates and therefore might regulate processes outside of cell metabolism [29]. This non-metabolic effect of the AMPK could be related to the significant increase observed in the progressive motility during boar semen storage at 17 °C at Days 1, 2, and 4 after AMPK inhibition; these results are in agreement with our previous results [6].

It has been clearly described that sperm handling for assisted reproduction, such as dilution, cooling, or long-term storage, affect the sperm surface mainly in the acrosomal region [18]. Therefore, during boar semen storage the spermatozoa plasmalemma needs to be stabilized to avoid an early capacitation or a loss in the integrity of the acrosomal membrane [18]. Our results suggest that spermatozoa AMPK activity contributes to the stability of the plasmatic and acrosomal membranes because: (1) the spermatozoa plasma membrane region surrounding the acrosome is especially modified during capacitation and also during sperm handling for artificial insemination [18];

the intracellular localization of AMPK in the head of spermatozoa is confined to this region; (2) activation of AMPK is sensitive to the liquid storage of sperm; our results show a clear increase in the phosphorylation of AMPK (active) correlative with storage time; (3) inhibition of AMPK potentiates the spermatozoa plasma membrane alterations observed during boar semen storage such as the increase in plasmalemma scrambling and the deterioration of the integrity of the acrosomal membrane.

Johnson et al. [1] described that the structural and functional changes of spermatozoa connected with liquid storage in boar semen resemble a natural aging process that precedes the aging of spermatozoa after artificial insemination waiting to be released from the lower part of the isthmus in response to the ovulation [1]. Our results point out that this postulated aging process would activate AMPK in boar spermatozoa and that AMPK is an important kinase for improving the quality of extended boar semen mainly after long-term storage.

#### 4.1. Conclusions

In summary, the present study demonstrates that during long-term storage of extended boar semen, the reduction in the percentage of spermatozoa showing high mitochondria membrane potential negatively correlates with an increase in AMPK phosphorylation at Thr<sup>172</sup> (active state). Moreover, AMPK inhibition during boar semen storage at 17 °C causes a significant decrease in spermatozoa velocity and a decrease in plasmalemma and acrosome membrane integrity. In conclusion, our study points to an important regulatory role of AMPK in the maintenance of the quality of extended boar semen during long-term storage at 17 °C.

#### Acknowledgments

This work was supported by National grant AGL2010-15188 (from the Spanish Ministry of Education and Science) and regional grants PRI09A077 and GR10156 (from Junta de Extremadura, Spain). D. Martin-Hidalgo received a PhD fellowship award from the Junta de Extremadura and European Social Fund, Spain.

#### References

- [1] Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 2000;62:143–72.
- [2] Gadea J. Review: semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Span J Agric Res* 2003;1:17–27.
- [3] Pursel VG, Johnson LA. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci* 1975;40:99–102.
- [4] Johnson LA, Aalbers JG, Willems CM, Rademaker JH, Rexroad Jr CE. Use of boar spermatozoa for artificial insemination. III. Fecundity of boar spermatozoa stored in Beltsville liquid and Kiev extenders for three days at 18 °C. *J Anim Sci* 1982;54:132–6.
- [5] Medrano A, Pena A, Rigau T, Rodriguez-Gil JE. Variations in the proportion of glycolytic/non-glycolytic energy substrates modulate sperm membrane integrity and function in diluted boar samples stored at 15–17 degrees C. *Reprod Domest Anim* 2005;40:448–53.
- [6] Hurtado de Llera A, Martin-Hidalgo D, Gil MC, Garcia-Marin LJ, Bragado MJ. AMP-Activated kinase AMPK is expressed in boar spermatozoa and regulates motility. *PLoS One* 2012;7:e38840.
- [7] Corton JM, Gillespie JG, Hardie DG. Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. *Curr Biol* 1994;4:315–24.
- [8] Crute BE, Seefeld K, Gamble J, Kemp BE, Witters LA. Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1998;273:35347–54.
- [9] Stein SC, Woods A, Jones NA, Davison MD, Carling D. The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem J* 2000;34:437–43.
- [10] Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway—new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 2004;117:5479–87.
- [11] Kemp BE, Mitchelhill KI, Stapleton D, Michell BJ, Chen ZP, Witters LA. Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends Biochem Sci* 1999;24:22–5.
- [12] Schmidt H, Kamp G. Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction* 2004;128:171–9.
- [13] Bragado MJ, Aparicio IM, Gil MC, Garcia-Marin LJ. Protein kinases A and C and phosphatidylinositol 3 kinase regulate glycogen synthase kinase-3A serine 21 phosphorylation in boar spermatozoa. *J Cell Biochem* 2010;109:65–73.
- [14] Martin-Hidalgo D, Baron FJ, Bragado MJ, Carmona P, Robina A, Garcia-Marin LJ, et al. The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 °C. *Theriogenology* 2011;75:1550–60.
- [15] Aparicio IM, Bragado MJ, Gil MC, Garcia-Herreros M, Gonzalez-Fernandez L, Tapia JA, et al. Porcine sperm motility is regulated by serine phosphorylation of the glycogen synthase kinase-3alpha. *Reproduction* 2007;134:435–44.
- [16] Haugan T, Reksen O, Grohn YT, Gaustad AH, Hofmo PO. A retrospective study on effects of storage time of liquid boar semen on reproductive performance in Norwegian swine. *Theriogenology* 2005;64:891–901.
- [17] De Ambrogi M, Ballester J, Saravia F, Caballero I, Johannisson A, Wallgren M, et al. Effect of storage in short- and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. *Int J Androl* 2006;29:543–52.
- [18] Leahy T, Gadella BM. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction* 2011;142:759–78.
- [19] Leahy T, Gadella BM. Capacitation and capacitation-like sperm surface changes induced by handling boar semen. *Reprod Domest Anim* 2011;46(Suppl. 2):7–13.
- [20] Waterhouse KE, De Angelis PM, Haugan T, Paulenz H, Hofmo PO, Farstad W. Effects of *in vitro* storage time and semen-extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry. *Theriogenology* 2004;62:1638–51.
- [21] Gogol P, Szczesniak-Fabianczyk B, Wierchosz-Hilczner A. The photon emission, ATP level and motility of boar spermatozoa during liquid storage. *Reprod Biol* 2009;9:39–49.
- [22] Rodriguez-Gil JE. Mammalian sperm energy resources management and survival during conservation in refrigeration. *Reprod Domest Anim* 2006;41(Suppl. 2):11–20.
- [23] Carling D, Sanders MJ, Woods A. The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Int J Obes (Lond)* 2008;32(Suppl. 4):S55–9.
- [24] Hardie DG. AMP-activated protein kinase: a master switch in glucose and lipid metabolism. *Rev Endocr Metab Disord* 2004;5:119–25.
- [25] Khan M, Haq E, Giri S, Singh I, Singh AK. Peroxisomal participation in psychosine-mediated toxicity: implications for Krabbe's disease. *J Neurosci Res* 2005;80:845–54.
- [26] Solaz-Fuster MC, Gimeno-Alcaniz JV, Ros S, Fernandez-Sanchez ME, Garcia-Fojeda B, Criado GO, et al. Regulation of glycogen synthesis by the laforin-malin complex is modulated by the AMP-activated protein kinase pathway. *Hum Mol Genet* 2008;17:667–78.
- [27] Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction. *Hum Reprod* 2005;20:3459–68.
- [28] Marsin AS, Bouzin C, Bertrand L, Hue L. The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *J Biol Chem* 2002;277:30778–83.
- [29] Hardie DG. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev* 2011;25:1895–908.