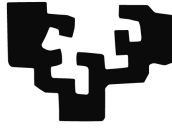


eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

**Facultad de Medicina y Odontología**  
**Departamento de Fisiología**

**Medikuntza eta Ondotologia Fakultatea**  
**Fisiologia Saila**

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA EN  
ESPERMATOZOIDES ASTENOZOOSPÉRMICOS.  
COMPARACIÓN CLÍNICA.**

**MEMORIA PRESENTADA POR:**

**M<sup>a</sup> OLGA RAMÓN MARTÍNEZ**

**DIRIGIDA POR LOS DOCTORES:**  
**LUIS CASIS SAENZ**  
**JUAN M<sup>a</sup> MUGICA GARAY**



# **INDICE**



## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1. ANATOMIA DEL APARATO REPRODUCTOR**

#### **1.1. APARATO REPRODUCTOR FEMENINO**

1.1.1. Genitales externos

1.1.2. Genitales internos

#### **1.2. APARATO REPRODUCTOR MASCULINO**

1.2.1. Testículos

1.2.2. Epidídimo

1.2.3. Conductos deferentes

1.2.4. Glándulas complementarias

### **2. BIOLOGÍA REPRODUCTIVA**

#### **2.1. GAMETO FEMENINO**

2.1.1. Oogénesis

2.1.2. Etapa de formación de folículo

2.1.3. Ovario neonatal

2.1.4. Ovario adulto

#### **2.2. GAMETO MASCULINO**

2.2.1. Espermatogénesis

2.2.2. Estructura de los espermatozoides

2.2.3. Maduración espermática

2.2.4. Eyaculación espermática

2.2.5. Activación de la movilidad espermática

#### **2.3. TRANSPORTE DE LOS ESPERMATOZOIDES**

2.3.1. Aparato genital masculino

2.3.2. Vagina

2.3.3. Moco cervical

2.3.4. Útero

2.3.5. Trompas de Falopio

#### **2.4. TRANSPORTE DEL OVULO**

#### **2.5. CAPACITACION ESPERMATICA Y FERTILIZACION**

2.5.1. Movilidad hiperactiva

2.5.1.1. Unión al epitelio tubarico

2.5.1.2. Ca<sup>2+</sup>

2.5.1.3. Canales de membrana

2.5.2. Capacidad de unión a la zona pelucida

2.5.3. Reacción acrosómica

### **3. ESTUDIO DE LA FERTILIDAD MASCULINA**

- 3.1. Parámetros seminales
- 3.2. Pruebas de funcionalidad espermática
  - 3.2.1. Interacción seminal con ovocitos humanos
  - 3.2.2. Pruebas de integridad de la membrana espermática
- 3.3. Estudios genómicos
  - 3.3.1. Fragmentación del DNA espermático
  - 3.3.2. Estudio de anomalías cromosómicas espermáticas mediante FISH
  - 3.3.3. Anomalías meioticas en biopsia testicular

### **4. INSEMINACIÓN INTRAUTERINA**

- 4.1. Indicaciones
- 4.2. Definición
- 4.3. Metodología
- 4.4. Resultados
- 4.5. Factores pronósticos

### **5. ENZIMAS PROTEOLÍTICOS**

- 5.1. Enzimas degradadoras de Péptidos Bioactivos: Peptidasas
- 5.2. Clasificación y Nomenclatura de las Peptidasas

### **6. AMINOPEPTIDASAS ESTUDIADAS. CARACTERÍSTICAS GENERALES**

- 6.1. Endopeptidasa neutra (NEP, E.C.3.4.24.11)
- 6.2. Aminopeptidasa N (APN, E.C.3.4.11.2)
- 6.3. Prolil endopeptidasa (E.C.4.21.26., prolil oligopeptidasa, PEP, seryn proteasa soluble)
- 6.4. Dipeptidyl peptidasa IV (DPPIV, E.C.3.4.14.5, T-cell activation antigen CD26)
- 6.5. Piroglutamil peptidasa I
- 6.6. Aminopeptidasa B (APB, Aminopeptidasa básica, E.C.3.4.11.6)
- 6.7. Aminopeptidasa A (APA, Aminopeptidasa acida, E.C.3.04.11.7)

### **7. PÉPTIDOS BIOACTIVOS**

- 7.1. Péptidos opioides endógenos
  - 7.1.1. Precursores de los péptidos endógenos
  - 7.1.2. Péptidos opioides endógenos
  - 7.1.3. Acciones fisiológicas de los péptidos y sus receptores
  - 7.1.4. Implicación del sistema opioide en la fertilidad masculina
- 7.2. Otros péptidos de interés
  - 7.2.1. TRH (thyrotropin-releasing hormona)
  - 7.2.2. Angiotensina II
  - 7.2.3. Taquicinas y Sustancia P

- 7.2.4. FPP (fertilization promoting peptide)
- 7.2.5. Bombesina
- 7.2.6. Neurotensina
- 7.2.7. GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas)
- 7.2.8. GnIH (hormona inhibidora de gonadotropinas)
- 7.2.9. Hormonas Neurohipofisarias: Oxitocina y Vasopresina

## **8. AMINOPEPTIDASAS Y FERTILIDAD**

### **II. OBJETIVOS**

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **1. SUJETOS DE ESTUDIO**

- 1.1. Inclusión
- 1.2. Estimulación ovárica
- 1.3. Muestras seminales para uso clínico
  - 1.3.1. Recogida de las muestras seminales
  - 1.3.2. Evaluación de las muestras
  - 1.3.3. Preparación de la muestra
  - 1.3.4. Análisis de la movilidad espermática
- 1.4. Inseminación
- 1.5. Fase lutea
- 1.6. Definición de embarazo

#### **2. DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS**

##### **2.1. Material**

- 2.1.1. Equipamiento
- 2.1.2. Reactivos
- 2.1.3. Soluciones

##### **2.2. Análisis de la actividad por ensayos enzimáticos**

- 2.2.1. Preparación de la muestra
- 2.2.2. Determinación de la actividad de las aminopeptidasas
  - 3.2.2.1. Fundamento general
  - 3.2.2.2. Fundamento particular para cada enzima
  - 3.2.2.3. Análisis de datos de las actividades peptidasicas
  - 3.2.2.4. Técnica para la cuantificación de proteínas

### **III. RESULTADOS**

#### **1. CLINICOS**

## **2. ENZIMÁTICOS**

- 2.1. Actividad enzimática en medio capacitante
- 2.2. Actividad enzimática en medio capacitante, en el tiempo
  - 2.2.1. Desde la capacitación
  - 2.2.2. Desde la obtención seminal

## **3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y CORRELACIÓN CLÍNICA**

- 3.1. Actividad enzimática y número de espermatozoides
- 3.2. Actividad enzimática y embarazo
- 3.3. Actividad enzimática, embarazo y variación en el tiempo

## **IV. DISCUSIÓN**

### **1. SOBRE LOS RESULTADOS CLÍNICOS OBTENIDOS**

### **2. REGULACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS Y FERTILIDAD**

- 2.1. Sobre la distribución enzimática obtenida
- 2.2. Sobre las modificaciones metabólicas en el tiempo

### **3. INTEGRACIÓN DE RESULTADOS**

## **V. CONCLUSIONES**

## **VI. BIBLIOGRAFIA**





# **I. INTRODUCCIÓN**



## 1. ANATOMIA DEL APARATO REPRODUCTOR

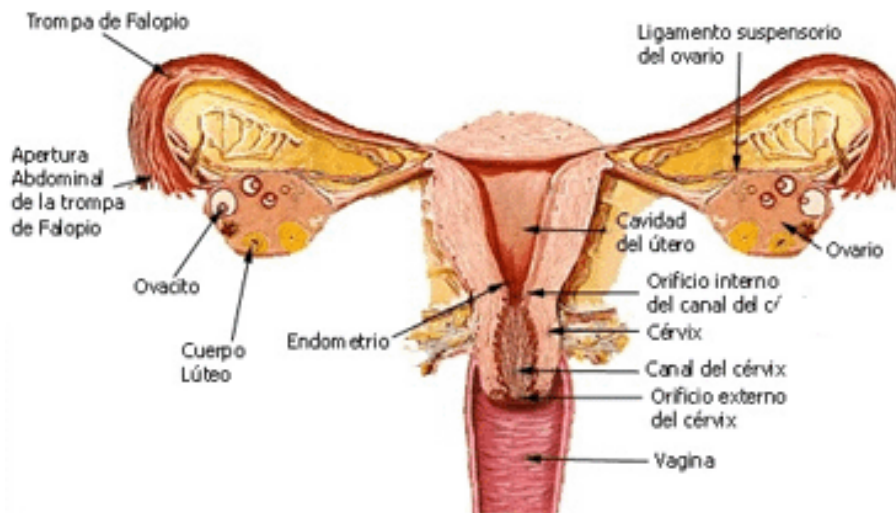
### 1.1. APARATO REPRODUCTOR FEMENINO

El aparato genital femenino (figura 1) esta constituido por una serie de estructuras perfectamente interrelacionadas para facilitar la función reproductiva. Se dividen, por ubicación, en genitales externos e internos.

#### 1.1.1. Genitales externos.

Externamente pueden apreciarse dos estructuras llamadas *labios mayores*, que rodean a la hendidura vulvar, y presentan la forma de repliegues cutáneos anchos. Están cubiertos externamente por vello y se unen por delante formando el monte de Venus, perdiéndose dorsalmente en la región anal.

- Al separar los labios mayores encontramos dos repliegues de piel fina, arrugada y sin vello, denominados *labios menores*.
- Los labios menores se unen por delante formando una especie de capuchón que al ser levantado descubre el *clítoris*. Éste es el órgano más sensible y zona de máxima excitabilidad sexual de la mujer.
- El *meato urinario* es un orificio pequeño en el cual desemboca la uretra, y por donde se elimina la orina.
- El *orificio vaginal*, lugar donde desemboca la vagina.
- A ambos lados del orificio vaginal encontramos las *glándulas de Bartholino*, cuya secreción lubrica al espacio comprendido entre los dos labios (vestíbulo vaginal). Sólo se visualizan durante procesos inflamatorios.
- En las mujeres antes de la iniciación sexual, una delgada membrana llamada *himen* ocluye la desembocadura de la vagina. Su función es la protección contra las infecciones hasta el comienzo de la actividad sexual.



**FIGURA 1.-** Esquema del aparato reproductor femenino.

### 1.1.2. Genitales internos

Los órganos genitales internos están ubicados en la pelvis menor y se encuentran protegidos por la pelvis ósea.

#### a. Vagina.

Es un conducto elástico de 8 a 10 cm. de longitud, situada entre la vejiga y el recto que comunica al útero con el exterior, Su orificio está rodeado por los genitales externos. Es un órgano sexual secundario que recibe el semen eyaculado del coito. Consta de pared anterior y posterior, que están en contacto; en sus paredes se observan pliegues transversales dependientes de la mucosa vaginal.

#### b. Útero.

Es un órgano impar, hueco, de pared gruesa, muscular, en forma de pera, de unos 8 cm. de longitud, 5 cm. de anchura y pesa unos 50 gramos. Se divide en tres partes:

1. *Cuerpo*: es la parte más voluminosa del útero. Esta constituido por tres capas principales de dentro a fuera: mucosa o endometrio, muscular o miometrio y serosa o perimetrio:

Endometrio: Constituye la mucosa que tapiza interiormente la cavidad corporal uterina. Su característica principal radica en su perfecta respuesta a los estímulos hormonales del ovario que se traduce en importantes cambios morfológicos, que conducen a su descamación cada 28 días, en ausencia de gestación, constituyendo el denominado "ciclo endometrial" (González Merlo y cols., 1972).

Miometrio: Tiene unos 2 cm. de grosor y se componen principalmente de músculo liso o *involuntario*, distribuidas en tres tipos de capas, siendo la mas voluminosa la capa de fibras musculares de distribución espiroidea que permite y facilita el crecimiento uterino durante el desarrollo fetal.

Perimetrio: Es la serosa peritoneal que recubre las caras anterior y posterior del cuerpo uterino.

2. *Istmo*: es la parte estrecha del útero, localizado entre el cuerpo y el cervix, con un menor contenido de fibras musculares.
3. *Cuello*: es la parte del útero que contacta con la vagina. Mide 2-3 cm. y consta de una porción supravaginal y una porción vaginal alrededor de la cual se constituye el fornix vaginal. El conducto cervical comunica con la cavidad uterina a través del conducto cervical interno y con la vagina a través del conducto cervical externo. Esta revestido de una capa de células cilíndricas, especializadas en la formación y secreción mucosa que presentan una actividad cíclica hormono-dependiente, con una máxima producción durante el periodo periovulatorio, aumentando sus propiedades reológicas, de fluidez, transparencia, claridad y filancia y cambiando su composición bioquímica, adquiriendo un mayor componente acuoso, mineral e hidrocarbonado.

La fluidez del moco, en esta fase, hace posible su salida a través del orificio cervical externo de modo que se favorece su contacto con los espermatozoides, protegiéndolos del pH ácido vaginal, lítico para los mismos. La disposición reticular de las glucoproteínas del moco en esta fase orienta la progresión de los espermatozoides en la dirección del eje del canal cervical, posibilitando un desplazamiento más rectilíneo y una motilidad mayor que en el plasma seminal, determinando además la secreción cervical, junto con la uterina y la tubarica, la

capacitación espermática. Es decir, el moco cervical actúa a modo de sistema de filtro que solo permite el paso de los espermatozoides más móviles y elimina el líquido seminal, cuyos componentes inhiben la reacción acrosómica (Ludmir y cols., 2000).

El útero mantiene su posición dentro de la pelvis mediante unos medios de sujeción: ligamento ancho, mesosalpinx, ligamentos redondos, ligamentos cardinales o de Mackenrod, y los ligamentos úterosacros.

### **c. Trompas de Falopio.**

Son conductos pares musculares de unos 10 cm. de longitud, que comunican la cavidad uterina con la cavidad abdominal y que están situados en el borde superior del ligamento ancho. Su principal función es el transporte de gametos y embriones y están dotadas de gran movilidad. Se distinguen cuatro zonas: la *intersticial* o porción intrauterina, seguida por la zona *ístmica* (recta y de paredes gruesas), que se ensancha en su zona más distal, constituyendo la *ampolla tubarica*, delimitada por las *fimbrias tubaricas*, fundamentales para la captación del ovocito, durante la ovulación.

### **d. Ovarios.**

Se pueden definir como los órganos sexuales primarios responsables de la producción de ovocitos secundarios, llamados óvulos y de la secreción endocrina de hormonas sexuales femeninas (estrógenos y progesterona), que controlan el ciclo menstrual, el desarrollo de los órganos sexuales, las glándulas mamarias y caracteres sexuales secundarios.

Es un órgano par, situado en la pared lateral de la pelvis, en la fosa ovárica, uno a cada lado del útero. Tiene forma ovoidea, con un diámetro mayor de 3 a 5 cm., en la mujer adulta. El polo superior está relacionado íntimamente con la ampolla tubarica de la trompa de Falopio, y el polo inferior está unido al útero por el ligamento útero ovárico.

El ovario está recubierto por el epitelio ovárico superficial. En su interior se encuentra el *estroma*, constituido por la zona cortical y la zona medular; en la zona cortical, se encuentran los folículos primordiales, constituido por un ovocito primario, rodeado por una capa simple de células de la granulosa y en la parte central

encontramos la *médula* donde se encuentran nervios, vasos linfáticos y sanguíneos.

Al nacimiento ya se encuentran en el estroma cortical aprox. unos 2 millones de ovocitos, para llegar a la pubertad con una dotación de unos 300-400 mil ovocitos en cada ovario. Sólo 400-500 llegarán a la ovulación y de ellos sólo un 5% tendrán la posibilidad de ser fecundados. En cada ciclo menstrual unos 15 a 20 folículos inician el crecimiento, pero sólo uno contendrá un ovocito maduro que será liberado, El resto de los folículos, junto con sus ovocitos demás degeneran. El folículo maduro (llamado de *De Graaf*) rompe su pared folicular y libera en la superficie del ovario un óvulo maduro hacia la trompa de Falopio, proceso denominado *ovulación*. En el ovario el folículo vacío se somete a un proceso llamado *luteinización* para formar el *cuerpo lúteo*, productor de progesterona. Esta estructura desaparece si no hay embarazo.

## **1.2. APARATO REPRODUCTOR MASCULINO**

El aparato genital masculino está constituido por una serie de estructuras, cuya función es la producción, maduración y depósito de espermatozoides en el aparato genital femenino para facilitar la función reproductiva. La figura 2 muestra los diferentes órganos que forman el aparato reproductor masculino. Seguidamente analizaremos la localización y función de cada una de las partes. (Figuras 2 y 3)

### **1.2.1. Testículos.**

Los testículos son órganos especializados, responsables de la creación y almacenamiento de los espermatozoides. La localización de los testículos en el escroto es importante para la producción de espermatozoides, que es óptima a temperaturas de 2-3<sup>o</sup> C por debajo de la temperatura corporal central (Munkeilwitz y cols., 1998) (Zorgnotti y cols., 1980). El parénquima testicular está recubierto por una fina membrana fibrosa con elementos musculares lisos de capacidad contráctil (*túnica albugínea*) y consta de dos partes bien diferenciadas: *la corteza* y *la médula*, siendo esta última, a diferencia del ovario, la parte más desarrollada:

#### **a. Los túbulos seminíferos.**

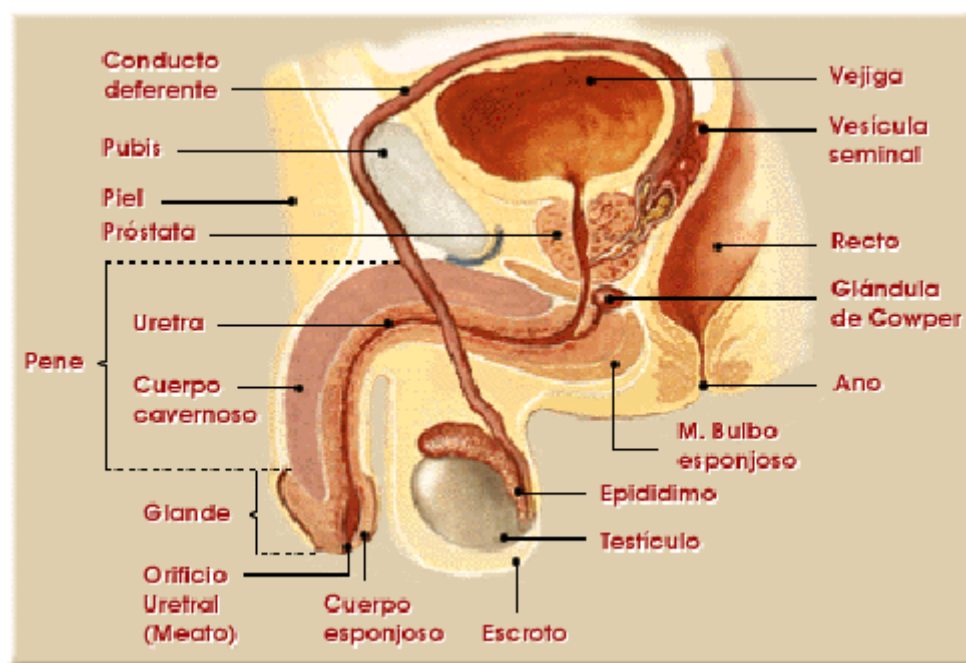
Se encuentran en la médula testicular, y es el lugar de producción de los espermatozoides. Cada testículo contiene cientos de



túbulos seminíferos densamente empaquetados. Los túbulos están organizados en lóbulos separados, pero todos se abren hacia la rete testis (Rhoades y cols., 1995).

### b. La rete testis.

Los túbulos seminíferos vierten su contenido en una estructura recolectora llamada rete testis y mediante los *conductos eferentes* es llevada al epidídimo (Guyton y cols., 1997).

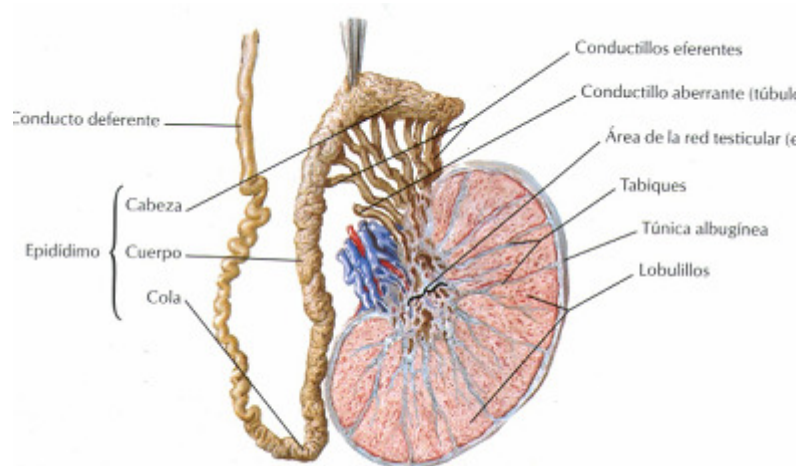


**FIGURA 2.-** Esquema del aparato reproductor masculino.

### 1.2.2. Epidídimo.

El epidídimo es el conducto situado detrás de los testículos; su función es unir los conductos deferentes y los testículos. Los hombres tienen dos epidídimos, uno por cada testículo. El epidídimo se divide en tres partes: la cabeza del epidídimo, el cuerpo y la cola (Rhoades y cols., 1995). En el hombre el epidídimo, mide entre 4-5 metros de

largo y los espermatozoides necesitan mas de tres días para recorrer ese camino (Wen y cols., 2000) Este órgano es muy importante en el proceso de maduración y en la movilidad de los espermatozoides (Cosentino y cols., 1986). Las secreciones de los testículos y epidídimos suponen el 5% del eyaculado, pero ayudan a la adquisición de propiedades imprescindibles para el proceso de reproducción llevado a cabo por los gametos (Jequier y cols., 1986).



**FIGURA 3.-** Esquema del testículo y epidídimo.

### 1.2.2. Epidídimo.

El epidídimo es el conducto situado detrás de los testículos; su función es unir los conductos deferentes y los testículos. Los hombres tienen dos epidídimos, uno por cada testículo. El epidídimo se divide en tres partes: la cabeza del epidídimo, el cuerpo y la cola (Rhoades y cols., 1995). En el hombre el epidídimo, mide entre 4-5 metros de largo y los espermatozoides necesitan mas de tres días para recorrer ese camino (Wen y cols., 2000) Este órgano es muy importante en el proceso de maduración y en la movilidad de los espermatozoides (Cosentino y cols., 1986). Las secreciones de los testículos y epidídimos suponen el 5% del eyaculado, pero ayudan a la adquisición de propiedades imprescindibles para el proceso de reproducción llevado a cabo por los gametos (Jequier y cols., 1986).

### **1.2.3. Conductos deferentes.**

El conducto deferente recoge el contenido del epidídimo y lo transporta hasta el conducto eyaculador. Las ampollas situadas en ese trayecto funcionan como almacén de semen.

### **1.2.4. Glándulas complementarias.**

El semen consiste en una suspensión de espermatozoides en plasma seminal. Aunque el contenido de espermatozoides es solo de origen testicular, el hecho es que en el semen existen secreciones de todas las glándulas del tracto genital. Estas secreciones proceden, por tanto, de las vesículas seminales, la próstata y glándulas bulbo uretrales (Jequier y cols., 1986). Cada una de las secreciones es vertida independientemente, en la parte posterior de la uretra, en un proceso que se denomina *emisión*. La emisión empuja al esperma desde los epidídimos hacia la uretra. En este trayecto, se unen los espermatozoides y las secreciones de todas las glándulas complementarias. El estímulo induce la contracción del músculo liso que rodea los epidídimos, los conductos deferentes y el conducto eyaculador (Rhoades y cols., 1995).

#### **a. Vesículas seminales.**

Las vesículas seminales son un par de estructuras localizadas en la parte posterior del trigono de la vejiga urinaria. Aportan el 40-80% del líquido seminal. Su secreción es gelatinosa, ligeramente amarilla y de reacción alcalina. Contiene mucha fructosa (el sustrato principal para la glucólisis del espermatozoide) ácido ascórbico y prostaglandinas. Posee una importante propiedad tampón (Jequier y cols., 1986).

#### **b. Próstata.**

La próstata es una glándula que se sitúa debajo de la vejiga y rodea la base de la uretra, vertiendo su contenido a la luz uretral durante la eyaculación (Rhoades y cols., 1995). La secreción de la próstata contribuye en un 13-33% al volumen del eyaculado, es fluida e incolora y tiene el pH ácido. Aporta al líquido seminal gran contenido de prostaglandinas y contiene concentraciones muy altas de zinc, así como de numerosas enzimas (proteasa, fosfatasas ácidas, etc.). Esa secreción contiene unas vesículas membranosas llamadas *prostasomas* que regula algunos procesos importantes para la fertilización. (Jequier y cols., 1986). En los prostasomas se han identificado compuestos

lipídicos (colesterol, esfingomielinas, etc....) iones y moléculas pequeñas ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ , GDP, ADP, ATP....) y diversas proteínas (33.8% enzimas, 19% proteínas transportadora, 17.3% proteínas transductoras de señales, 14.4% proteínas GPT y 5.8% cheperonas (Utleg y cols., 2003).

### **c. Glándulas bulbo uretrales de Cowper.**

Las glándulas bulbo uretrales vierten su contenido al interior de la uretra. Aportan el 2-5% del volumen seminal y tienen dos tipos de secreciones, una viscosa y la segunda más acuosa ricas en glucoproteínas. (Jequier y cols., 1986). Su contenido puede ser liberado antes de la eyaculación, facilitando la lubricación genital.

### **d. Uretra.**

Es la última estructura entre el testículo y el medio externo. Se divide en uretra *prostática*, *membranosa* y *peneana*. La uretra peneana esta rodeada por el cuerpo esponjoso y sobre esta se encuentra el cuerpo cavernoso. Todas estas estructuras musculares toman parte en la erección del pene. El paso del semen de la uretra al exterior se denomina *eyaculación* (Guyton y cols., 1997).

## **2. BIOLOGÍA REPRODUCTIVA**

### **2.1. GAMETO FEMENINO (ÓVULO).**

#### **2.1.1. Oogénesis**

Las células germinales embrionarias (entre mil y dos mil), alcanzan, mediante movimientos ameboides, las crestas gonadales entre la cuarta y la sexta semana de gestación, en un proceso común para ambos sexos. La presencia del cromosoma Y determina la aparición de TDF (testes-determining factor) y la diferenciación gonadal en testículo (Sinclair y cols., 1990).

La ausencia de cromosoma Y, permite la diferenciación gonadal femenina. A partir de la 6<sup>o</sup> semana se produce una rápida multiplicación mitótica de las células germinales, alcanzando una concentración de 6 a 7 millones de ovogonias a las 16-20 semanas de gestación (Gondos y cols., 1986). Las oogonias se transforman en ovocitos cuando inician la primera división meiotica. La progresión de

la meiosis hasta la etapa de diplotene continúa durante el resto del embarazo y esta completa al nacimiento. La detención de la meiosis al final de la primera etapa probablemente se da por la acción de sustancias inhibitoras producidas por las células de la granulosa. Esta fase de parada se llama *dictiotene*.

### **2.1.2. Etapa de formación de folículo**

Hacia la 18-20 semana de gestación, la corteza gonadal es perforada por canales vasculares originados en las regiones medulares más profundas, dividiendo la masa celular cortical en pequeños fragmentos. Los vasos sanguíneos traen consigo células perivasculares mesenquimatosas que rodean a los ovocitos que han completado la primera etapa de meiosis. La unidad resultante es el *folículo primordial* (Ammini y cols., 1994). Este proceso tiene lugar aparentemente sin relación con las gonadotropinas (Rabinovici y cols., 1990)

### **2.1.3. Ovario neonatal**

Durante la segunda mitad de la gestación se produce una importante pérdida de ovocitos, reduciendo a 1-2 millones el número de ovocitos presentes al nacimiento (Himmelstein-Braw y cols., 1976). Los factores determinantes de este proceso no son conocidos, aunque parece jugar un papel importante en la atresia folicular, el proceso de *apoptosis* (muerte celular programada) de las células foliculares (Matsuda-Minehata F y cols., 2006). Como la dotación inicial de células germinales no se modifica, la mujer nace con una pérdida del 80% de sus ovocitos.

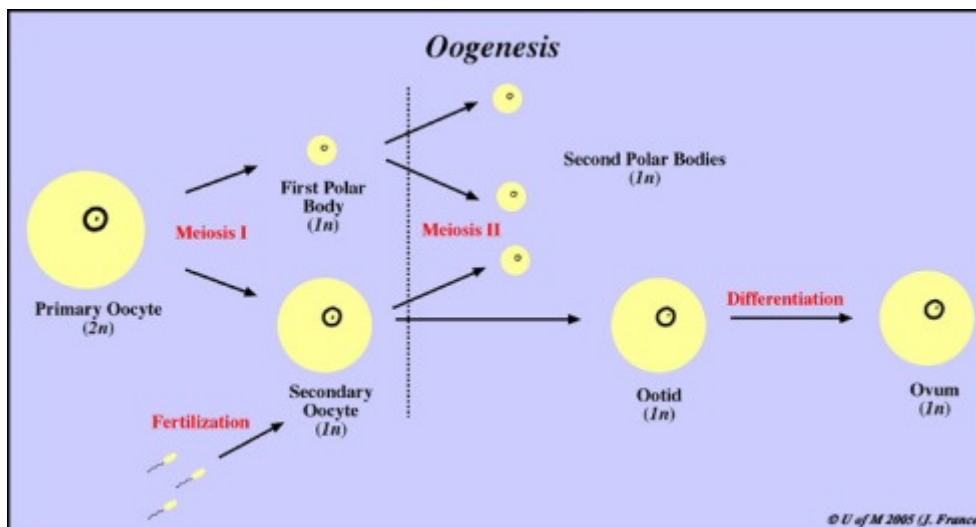


FIGURA 4.- Ovogénesis y maduración ovocitaria.

#### 2.1.4. Ovario adulto

El proceso de pérdida ovocitaria continua durante la infancia, de manera que al llegar a la pubertad la masa de células germinales se ha reducido a 300.000-500.000 unidades (Baker, 1963). Durante la vida fértil de la mujer se producirán de 400-500 ovulaciones, y por cada folículo que ovula, cerca de 1000 pasaran por procesos de crecimiento incompleto de duración variable. Con el tiempo, los folículos primarios se irán reduciendo hasta que al llegar la menopausia, solo queden unos cientos (Richardson y cols., 1987).

##### a. Crecimiento folicular

Actualmente se cree que el tiempo necesario para que un folículo primario evolucione hasta la ovulación, es de 85 días (Gougeon, 1996). El crecimiento inicial es independiente de las gonadotropinas, hasta alcanzar un estadio que permita el crecimiento ulterior en respuesta a la FSH. Al comienzo del ciclo menstrual, los niveles de FSH van a conseguir el reclutamiento de varios folículos, pero solo uno alcanzara la dominancia. La secreción de estrógenos y la inhibina folicular, producen una retroalimentación negativa sobre los niveles de FSH y los folículos con menor capacidad de respuesta se atresian, mientras que el dominante sigue creciendo hasta el momento de la ovulación. Una vez alcanzado un determinado estado de

crecimiento, el folículo se hace resistente a los cambios de FSH (Zelevnik, 2004).

### **b. Reinicio de la meiosis**

La FSH promueve la aparición de receptores de LH en las células de la granulosa, siendo máxima su concentración, en el momento preovulatorio. El pico de LH aparece 12-24 horas antes de la ovulación. Es la señal que dispara los distintos procesos celulares que en el folículo van a producir el reinicio de la meiosis, a través de la regulación de los niveles de AMPc en el ovocito. Los niveles elevados de AMPc bloquean la meiosis, mientras que su disminución la reinicia. Una de las vías propuestas para esta disminución, es la desconexión del ovocito con las células de la granulosa (facilitadas por los niveles de gonadotropinas), haciendo que el ovocito pierda las señales que estaba recibiendo a través de los *gap-junctions* (Russell y cols., 2007).

### **c. Ovulación**

La liberación física del ovocito y de su cúmulo de células de la granulosa es producida por el pico de LH, facilitando la descomposición de la capa de colágeno de la pared folicular (Yoshimura y cols., 1987). El pico de LH, además de reiniciar la meiosis ovocitaria, induce la producción de progesterona por las células de la granulosa, la expansión del cúmulo y la síntesis de prostaglandinas y otros eicosanoides esenciales para la ruptura folicular.

El aumento de progesterona induce un pico de FSH, que estimula la síntesis de ácido hialurónico que dispersa las células del cúmulo, permitiendo al conjunto ovocito-cúmulo, flotar libremente en el líquido folicular.

La FSH, LH, progesterona y prostaglandinas estimulan la actividad de enzimas proteolíticos que digieren el colágeno de la pared folicular hasta constituir el *estigma ovárico* (punto de ruptura del folículo) (Yoshimura y cols., 1987). Las prostaglandinas, además, facilitan la contracción de fibras musculares lisas, detectadas en el ovario, contribuyendo a la expulsión del conjunto ovulo-cúmulo (Miyazaki and cols, 1991).

## **2.2. GAMETO MASCULINO (ESPERMATOZOIDE)**

### **2.2.1. Espermatogénesis y su regulación**

#### **2.2.1.1. Espermatogénesis**

La espermatogénesis es un complejo y ordenado proceso de diferenciación de las células madres germinales primordiales (espermatogonias) hacia espermatozoides (Fig. 2). Este proceso ocurre en los testículos, concretamente en los túbulos seminíferos. En la infancia, la creación de gametos está en reposo, pero en la pubertad, junto a la subida de la concentración de hormona gonadotrófica (FSH y LH) las células de Leyding secretan testosterona y así da comienzo la espermatogénesis. En el ser humano, cada ciclo espermatogénico dura 64 días. Pero, antes de acabar cada ciclo, con una regularidad de 2-3 semanas, empiezan nuevos ciclos, que producen unos 120 millones de espermatozoides diarios (Amann y cols., 1980). El proceso se mantiene activo durante toda la vida aunque en la vejez se nota un descenso en la producción de espermatozoides (Marina, 2003).

La espermatogénesis comienza con la división de las células madre y finaliza con la formación de los espermatozoides maduros. Se completa en tres fases:

#### *a. Espermatocitogénesis*

Es una fase proliferativa, durante la cual algunas espermatogonias diploides ( $46, 2N$ ) (espermatogonias *Ad*) se dividen, bien para restaurar el pool de células madre (espermatogonias *Ad*) o para producir espermatogonias claras (espermatogonias *Ap*) capaces de realizar el proceso de diferenciación celular.

Las espermatogonias *Ap* experimentan un número limitado de divisiones mitóticas para formar un clon celular de espermatogonias *B*. ( $46, 2N$ ) que con una última división mitótica dan lugar a los *espermatoцитos primarios*. Estos se mantendrán en fase de preleptotene durante 24 días antes de proseguir con la meiosis (Kerr, 1992). Durante esta fase se produce una síntesis activa de DNA duplicándose su contenido en cada cromosoma y dando lugar a células diploides  $4n$  o tetraploides (Matsumoto, 1996).



### *b. Meiosis*

Es la fase en la que los espermatoцитos experimentan la transformación en *espermátides redondas* haploides, reduciendo el contenido genético. Durante este proceso se realizan dos divisiones meioticas: en la primera división meiotica, se produce el intercambio genético entre las tétradas formadas por el emparejamiento de cromosomas homólogos (*espermatoцитo primario*: 46, 4N) y la reducción del material genético dando lugar a los *espermatoцитos secundarios* (23,2N) (Russell y cols., 1990; Bustos-Obregon y cols., 1975; Clermont, 1991). Durante la segunda división meiotica, similar a una división mitótica, los espermatoцитos secundarios, se dividen, dando lugar a las *espermátides* (23, 1N) (Matsumoto, 1996).

### *c. Espermiogénesis*

Es el proceso por el cual las espermátides se transforman en espermatozoides maduros, a través de cambios morfológicos y funcionales, sin que haya división celular. Estos cambios son: la formación del acrosoma, mediante la transformación del aparato de Golgi; condensación y elongación del núcleo, eliminación de la mayor parte del citoplasma y formación de la cola adaptando organelas citoplasmáticas como el centríolo distal (flagelo) y las mitocondrias (pieza intermedia). El proceso de maduración termina con la *espermiación* o liberación de los espermatozoides a la luz del túbulo seminífero. Mediante movimientos peristálticos los espermatozoides son transportados de la *rete testis* a los conductos eferentes y de allí al epidídimo (Bustos-Obregon y cols., 1975). Aun así, estos espermatozoides no serán capaces de fecundar hasta sufrir los procesos de capacitación y reacción acrosómica, en el tracto reproductor femenino.

En el ser humano, cada ciclo espermatogénico dura 64 días. Pero, antes de acabar cada ciclo, con una regularidad de 2-3 semanas, empiezan nuevos ciclos. Es por esto que en cada túbulo seminífero encontramos células en diferente estado de maduración y las más desarrolladas aparecen en el lumen de los túbulos. En la parte basal de los túbulos se encuentran las células de Sertoli que son la barrera entre el túbulo y la sangre (Clermont, 1991) (Figura 5).

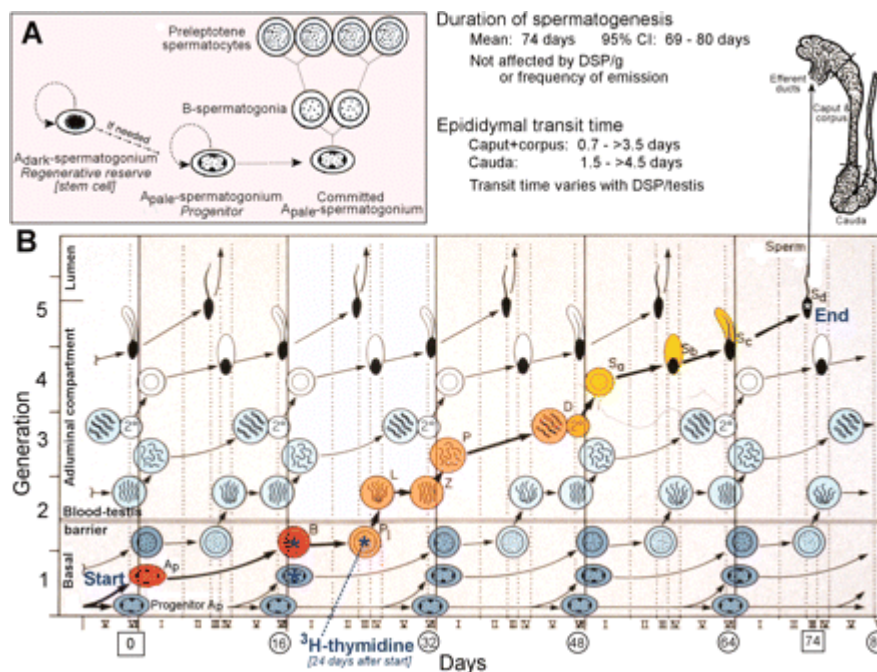


FIGURA 5.- Espermatogénesis.

### 2.2.1.2. Regulación Endocrina y Paracrina de la Espermatogénesis

La producción de andrógenos y la maduración de los gametos son reguladas en el testículo por el hipotálamo y la hipófisis a través de un mecanismo de retroalimentación negativo. La testosterona inhibe la secreción de FSH y LH; y la FSH tiene otro regulador que es la Inhibina. La LH estimula la producción de Testosterona en las células de Leyding, mientras que la FSH controla la espermatogénesis a través de las células de Sertoli.

La testosterona es el regulador local más importante de la espermatogénesis y aunque en un primer momento es la FSH la iniciadora de la espermatogénesis, será la testosterona la que mantenga modulado este proceso (Weinbauer y cols., 1997).

Además de esta regulación endocrina existe una regulación local o paracrina independiente de la regulación hormonal., habiéndose descrito actividad paracrina en células de Sertoli, Leydig, peritubulares, macrófagos y células germinales.

Han sido descritas distintas sustancias importantes en la regulación local de la espermatogénesis como son: los factores de crecimiento, entre los que se encuentran: el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  y  $\beta$  (TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ), la inhibina, la activina, el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento de la insulina-I (IGF-I), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de las células madre (SCF) y las interleukinas (IL). Estas sustancias tienen importantes efectos moduladores (inhibición - estimulación) sobre la espermatogénesis, que en un futuro pueden ser completadas por otras aun no conocidas y/o relacionadas (Weinbauer y cols., 1997).

### **2.2.2. Estructura de los espermatozoides**

La función de los espermatozoides es llegar al ovocito y fertilizarlo. Para conseguir ese objetivo, el espermatozoide cuenta con una morfología muy bien diferenciada. El espermatozoide de los mamíferos se suele dividir en dos partes principales: la cabeza y la cola.

#### **a. Cabeza**

Las estructuras mas reseñables dentro de la cabeza son el acrosoma, el núcleo y el citoplasma (muy reducido) (Browder y cols., 1991).

##### *Acrosoma*

Es una vesícula grande situada en la parte apical de la cabeza. Dentro de esta estructura se encuentran enzimas hidrolíticas capaces de digerir la matriz extracelular del ovocito (*zona pelucida*). Esos enzimas se liberan mediante la exocitosis del acrosoma (*reacción acrosómica*).

##### *Núcleo*

Se sitúa en la parte de la cabeza que queda detrás del acrosoma, en la zona post-acrosómica. En el núcleo espermático el DNA aparece muy condensado debido a que durante la espermatogénesis, las histonas son reemplazadas por protaminas. En el núcleo también aparece RNA que tiene funciones aun desconocidas. El núcleo espermático es la parte que debe penetrar en el ovocito.

### *Citoplasma*

Los espermatozoides maduros tienen un citoplasma muy reducido. La mayor pérdida del citoplasma se produce cuando los espermatozoides se van a liberar del epitelio de los túbulos seminíferos. Al fragmento de citoplasma que liberan se denomina *cuerpo residual*; esos cuerpos residuales contienen RNA empaquetado, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, lisosomas y peroxisomas y son fagocitados por las células de Sertoli.

Debido a la alta condensación de la cromatina nuclear, no se crea RNA de novo y debido a la pérdida de citoplasma y de orgánulos, el mRNA no se traduce a proteínas ni se da el transporte de vesículas. Por tanto, los espermatozoides maduros pierden la capacidad de expresar proteínas y de transportar vesículas (Millar y cols., 2006). Eso significa que los espermatozoides no sintetizaran nuevos compuestos y que por tanto, deberán llegar al ovocito con lo creado durante la espermatogénesis. Aun así, a lo largo del trayecto por el epidídimo, durante el tiempo en el que están en contacto con el líquido seminal (mediante epididimosomas) y/o a través del tracto femenino, ocurre un intercambio de proteínas y lípidos de la membrana plasmática espermática (Schuel y cols., 2005). De ese modo, puede ocurrir que los espermatozoides varíen su actividad en relación al medio en el que se encuentren. Por otra parte, la posibilidad de que algunos mRNA puedan ser traducidos mediante ribosomas mitocondriales deja en evidencia que este tema esté todavía en debate (Millar y cols., 2006).

### **b. Cola**

La cola de los espermatozoides tiene una estructura compleja y especializada con el fin de proporcionare movimiento a la célula. Morfológicamente se divide en cuatro partes: cuello, pieza media, pieza principal y pieza final (Mortimer y cols., 1997).

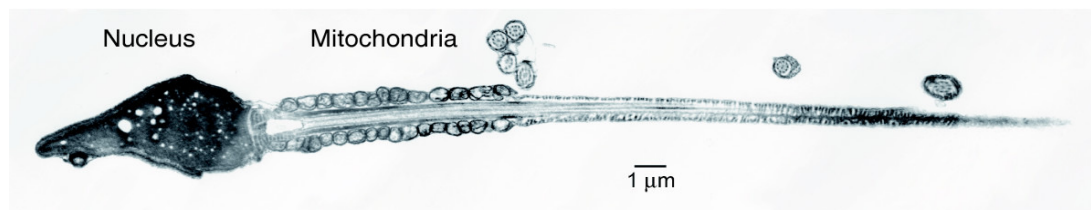
#### ***Cuello***

Es la articulación entre la cabeza y la cola

#### ***Pieza media***

Esta formada por el axonema y alrededor hay 9 fibras densas externas. Alrededor de estas fibras hay una capa de mitocondrias y

finalmente, rodeándolo todo, esta la membrana plasmática. En esta pieza se crea el ATP necesario para el movimiento flagelar.



**Figura 6.-** Micrografía electrónica de un espermatozoide humano. La célula tiene un núcleo compacto, las mitocondrias visibles, sin retículo endoplasmático; el citoplasma es mínimo y la cola es de gran tamaño (alrededor de 45  $\mu$  m de longitud) (Barratt y cols., 2009)

### ***Pieza principal***

Aquí también encontramos las fibras densas externas rodeando el axonema pero las fibras en posición 3ª y 8ª están sustituidas por dos columnas de fibras membranosas. Estas dos columnas se encuentran unidas. Finalmente, esta la membrana plasmática rodeando todo. En esta pieza también se crea ATP.

### ***Pieza final o flagelo***

Esta parte está formada por el axonema y la membrana plasmática. Los espermatozoides utilizan el flagelo para moverse. El movimiento es debido a la batida flagelar que crea el axonema en un proceso que requiere energía. El axonema está formado por microtúbulos y proteínas unidas a estos y en el caso del espermatozoide, su estructura se mantiene a lo largo de toda la cola. Mas detalladamente, el axonema se compone por 9 pares de microtúbulos compuestos de tubulina creando un anillo y en el centro de este anillo se sitúan otros dos microtúbulos. Los brazos de dineína son las estructuras proteicas más importantes unidas a los microtúbulos. De hecho, como esa última proteína tiene actividad ATP-asa convierte la energía química en energía mecánica y de esa forma puede sufrir cambio conformacional. Así pues, el movimiento del flagelo ocurre por deslizamiento entre microtúbulos gracias al funcionamiento del motor tubulina/dineína (Marigomez y cols., 1999).

Los espermatozoides obtienen ATP principalmente por fosforilación oxidativa que se da en las mitocondrias presentes en la

pieza media del flagelo. Pero en las partes del flagelo carentes de mitocondrias, es muy importante el ATP conseguido mediante la glicólisis que se da en las fibras membranosas de la pieza principal (Turner, 2006).

### 2.2.3. Maduración espermática

Tras la finalización de la espermatogénesis, los espermatozoides son liberados a la luz de los túbulos seminíferos (espermiación). Sin embargo, carecen de movimiento y de capacidad fertilizante. Para adquirirlas, deben someterse a un complejo cambio fisiológico y bioquímica, denominado "*maduración espermática*", que se realiza fundamentalmente en su paso por el epidídimo al que llegan a través del conducto eferente desde la rete testis mediante movimientos peristálticos.

Durante el paso entre la cabeza y la cola del epidídimo, los espermatozoides adquieren movilidad a través de un mecanismo de fosforilización y des-fosforilización de proteínas presentes en el flagelo del espermatozoide, reguladas por mediadores intracelulares como,  $Ca^{2+}$ , el cAMP y el pH, procedente del microambiente del epidídimo (Tash y cols., 1994). Sin embargo, las principales modificaciones incluyen cambios en la composición lipídica y proteica de la membrana plasmática. (Retamal y cols, 2000; Sullivan y cols, 2005; Saether y cols, 2003; Sullivan y cols, 2007; Yanagimachi, 1994). Se ha postulado que el espermatozoide adquiere dichas modificaciones al fusionarse con los epididimosomas, unas vesículas membranosas presentes en el fluido del epidídimo que le transfieren al espermatozoide los lípidos y proteínas necesarias (Frennette y cols., 2002) para su maduración y capacidad reconocedora y fecundante del ovocito (Gatti y cols., 2004).

A pesar de que la función principal del líquido seminal es la del transporte de espermatozoides, se ha observado que estas células sufren modificaciones en su membrana plasmática cuando se encuentran suspendidos en él. El líquido seminal contiene vesículas membranosas, procedentes de la próstata denominadas prostasomas, que son capaces de fusionarse *in Vitro* con los espermatozoides en medios ácidos (pH 5.5) (Palmerini y cols., 2003) Sin embargo, esta fusión puede ser cuestionable *in vivo*, puesto que no se observan medios fisiológicos de esa acidez (Sostaric y cols., 2008).

Entre los efectos de los prostasomas en la maduración post-testicular de los espermatozoides se observa una actividad inmunosupresora (Rooney y cols., 1993) mejora de la movilidad espermática (Carlsson y cols., 1997) y prevención de la reacción acrosómica inducida por la progesterona (Palmerini y cols., 2003).

Aun así, la capacidad de fertilizar se adquiere en el tracto femenino tras los procesos de capacitación y reacción acrosómica (Sadler, 2004).

#### **2.2.4. Eyaculación espermática**

Antes de ser liberado al exterior, los espermatozoides pueden mantenerse durante tiempo en los túbulos deferentes y en sus ampollas. Cuando el hombre se excita, se produce una erección y empieza el proceso de emisión. En este proceso, los espermatozoides se unen a las secreciones que crean el líquido seminal. Una vez que la uretra se llena de semen, se crean señales sensitivas que desencadenan la eyaculación. El eyaculado está formado por un componente celular (espermatozoides) y otro líquido (líquido seminal).

El líquido seminal se encarga de que los espermatozoides lleguen al interior del tracto reproductor femenino, pero aparte de esto, los compuestos del líquido seminal contienen sustratos gelificantes (fibrinógeno, semenogelina) que coagulan temporalmente el eyaculado, evitando su expulsión vaginal y protegiendo a los espermatozoides del pH vaginal, manteniéndolos cerca del cervix uterino. Tras pasar 15-20 minutos se licua (por la fibrinolisisina) y de esa manera aumenta la movilidad espermática. Debido a los factores inhibidores presentes en el líquido seminal, la actividad espermática se encuentra reducida (impidiendo la capacitación y la reacción acrosómica) y, de esta forma, se mantiene la viabilidad de los espermatozoides. El pH del líquido seminal se encuentra entre 7.2 – 7.8 y ese pH ayuda en la movilidad. Un hombre fértil suele eyacular entre 2-6 ml de semen y en ese semen hay 50-250 millones de espermatozoides (Guyton y cols., 1997).

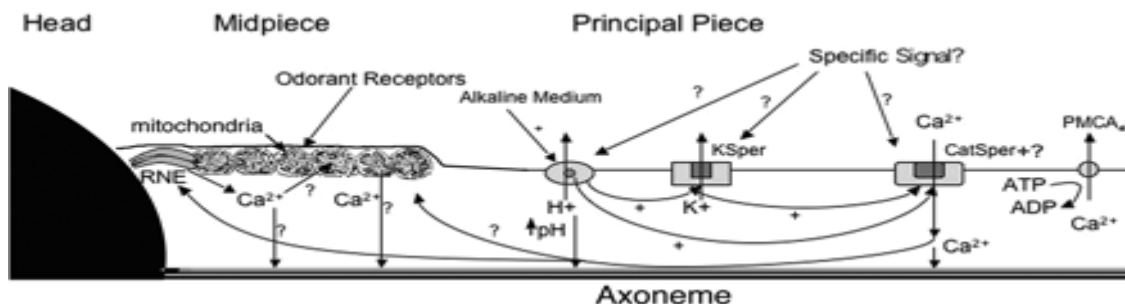
#### **2.2.5. Activación de la movilidad espermática**

Los espermatozoides son inmóviles tras la espermatogénesis, adquiriendo su movilidad a su paso por el epidídimo, donde adquieren

las moléculas necesarias para la activación de la movilidad espermática, la cual se manifiesta cuando entra en contacto con el plasma seminal, donde utilizan el flagelo para moverse. La motilidad de los espermatozoides es fundamental para la fertilidad masculina en los mamíferos (Wang, 2003). Los espermatozoides activados, dentro del plasma seminal, muestran trayectorias lineales que se correlacionan con las que fisiológicamente mostrarían al penetrar el moco cervical (Mortimer, y cols., 1997).

El movimiento es debido a la batida flagelar que crea el axonema. En el axonema existen unas 250 proteínas de distintos tipos: citoesqueléticas (tubulina), proteínas motoras (dineína), chaperonas, proteínas que unen calcio, proteínas quinasas y fosfatasa (Inaba, 2003). Cuando a los brazos de dineína del axonema se les une ATP, se pone en marcha su actividad ATPasa y por hidrólisis de ese ATP, la dineína sufre un cambio conformacional, que hace que se mueva por encima de los microtúbulos adyacentes. Pero las moléculas de la dineína presentes en el axonema no se activan a la vez; primeramente se activan las moléculas presentes en la base y poco a poco esa activación se propaga hasta la punta del axonema mediante una interacción proteína-proteína (Marigomez, 1999; Turner 2006). Los espermatozoides obtienen el ATP gracias a la fosforilación oxidativa que se da en las mitocondrias presentes en la pieza media del flagelo. Pero en las partes del flagelo carentes de mitocondrias es muy importante el ATP conseguido mediante la glucólisis que se da en las fibras membranosas de la pieza principal (Turner, 2006).

El flagelo de espermatozoides activados, genera unas trayectorias simétricas y progresivas que dirigen al espermatozoide con rectitud a través de medios no muy viscosos (Turner, 2006). De esta forma, los espermatozoides activados viajan mediante propulsión por el tracto reproductor femenino para llegar al oviducto.



**FIGURA 7.-** Representación esquemática de los mecanismos que pueden regular la hiperactivación espermática (Suarez, 2008).



Sin embargo, no tenemos una comprensión completa de las vías de señalización que regulan la función flagelar. Dos vías han surgido como reguladores clave de la movilidad espermática activa e hiperactiva en los mamíferos. Estas son las que ejercen la vía AMP cíclico (AMPC) / proteín-quinasa A (PKA) y la calmodulina, ambas dependientes de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de membrana o canales Catsper (Heffner y Storey, 1981; Suárez y cols., 1987; Tash y Means, 1987; Lindemann y Goltz, 1988; White y Aitken, 1989; Brokaw, 1991; Yanagimachi, 1994; Ho y cols., 2002; Nolan y cols., 2004; Marin-Briggiler y cols., 2005). (Figura 7)

### **a. Vía AMPC/PKA**

Hay pruebas que sugieren que la fosforilación de las proteínas de los flagelos, dependiente de cAMP está involucrado en la iniciación y mantenimiento de la motilidad de los espermatozoides (Tash y Means, 1982; Tash y Means, 1983; San Agustín y Witman, 1994). Ya que la PKA es una de las principales vías finales de AMPC en los espermatozoides, es probable que esta quinasa juegue un papel central en estos eventos de fosforilación (Visconti y cols., 1997). Como apoyo adicional del papel de PKA en la función espermática, se ha demostrado que los ratones que carecen en las células germinales de la subunidad catalítica de la PKA (Ca2) son infértiles debido a varias anomalías, incluidas las anomalías de la motilidad (Nolan y cols., 2004).

El  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular es necesario para la movilidad en los espermatozoides en el epidídimo, y se sabe que regulan tanto la movilidad activa como la hiperactiva (Suárez y cols., 1987; Tash y Means, 1987; Lindemann y Goltz, 1988; White y Aitken, 1989; Yanagimachi, 1994; Ho y cols., 2002). Uno de los mecanismos por los que el  $\text{Ca}^{2+}$  está directamente relacionado con la función flagelar es a través de la regulación de la, adenililciclase "soluble", SAC, lo que genera cAMP que activa la vía PKA (Jaiswal y Conti, 2003; Litvin, et al, 2003; Esposito y cols., 2004). El SAC es extraordinariamente sensible al bicarbonato y al  $\text{Ca}^{2+}$  (Buck y cols., 1999; Chen y cols., 2000; Wuttke y cols., 2001; Liguori y cols., 2004).

El cAMP es una señalización activa y aumenta la motilidad y frecuencia de la pulsación, pero no induce cambios profundos característicos de la hiperactivación de flexión de los flagelos. La activación de la motilidad del espermatozoide es un requisito previo para la hiperactivación, en el sentido de que los espermatozoides que no son activos, no puede convertirse en hiperactivos. La activación es dependiente de cAMP producida por la adenil ciclase o SAC o SACY. Los espermatozoides de ratones sin SACY no se puede activar plenamente,

aunque muestran un cierto movimiento lento (Esposito, 2004; Xie, 2006) Así, el cAMP producido por SACY es necesario para activar los espermatozoides y, en ese sentido, es un requisito previo para la hiperactivación. SACY se estimula por  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{HCO}_3^-$  (Xie y cols., 2006; Carlson, 2007) El AMPc generado por SACY activa la proteína quinasa A, que fosforila la serina o treonina proteica, lo que la convierte en una vía de señalización que conduce a la fosforilación de los residuos de tirosina en otras proteínas. El aumento de la fosforilación de la tirosina en flagelos se asocia con movilidad hiperactiva en el espermatozoide de hámster (SI y Okuno, 1999) y de mono (Mahony y Gwathmey, 1999), pero su verdadero papel no está del todo claro.

## **b. Calmodulina**

Además de la vía cAMP/PKA, se ha sugerido una segunda vía dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$ , que implica a la Calmodulina (CAM) en la movilidad espermática. Es una proteína de 17 Kd que sirve como un receptor intracelular clásico de  $\text{Ca}^{2+}$  (Means y cols., 1982). La CaM se ha localizado en el acrosoma y en la pieza principal flagelar, concretamente en la vaina fibrosa (FS) (Schlingmann y cols., 2007), estando implicada en múltiples funciones espermáticas, que incluyen la motilidad, la capacitación, y la reacción acrosomal (Jones y cols., 1980; Si y Olds-Clarke, 2000; Bendahmane y cols., 2001; López-González y cols., 2001)

Se ha observado una inhibición de la motilidad de los espermatozoides mediante la adición del antagonista de la CAM (W-7), lo que evidencia más directamente su papel en la movilidad seminal (White y Aitken, 1989; Ahmad y cols., 1995; Si y Olds-Clarke, 2000), pero los agonistas de la Vía PKA pueden restaurar el movimiento cuando la CaM se inhibe. Así, los componentes de la SAC / vía PKA pueden compensar la pérdida de la función en la vía  $\text{Ca}^{2+}$  / CaM siempre que los sustratos metabólicos del piruvato y lactato están presentes. Curiosamente, los efectos de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el SAC son independientes de la CAM (Jaiswal y Conti, 2003; Litvin y cols., 2003), lo que sugiere que el  $\text{Ca}^{2+}$  afecta a la movilidad a través de múltiples vías, sólo algunos de los cuales requieren CAM.

## **2.3. TRANSPORTE DE LOS ESPERMATOZOIDES**

### 2.3.1. Aparato genital masculino

Los espermatozoides producidos en el testículo llegan al epidídimo caudal aproximadamente a los 72 días del inicio de la espermatogénesis, siendo allí donde se almacenan, estando disponibles para la eyaculación. Durante el trayecto, van adquiriendo gradualmente movilidad y capacidad fertilizante. Durante este periodo, para que la función espermática se mantenga en condiciones óptimas, es necesario unos adecuados niveles de testosterona y una temperatura normal en el escroto (Foldes y cols., 1982)

### 2.3.2. Vagina

Casi inmediatamente después de la eyaculación, el semen forma un gel, que se licua a los 20-30 minutos, mediante enzimas originadas en la glándula prostática. El pH alcalino del semen protege a los espermatozoides del pH ácido vaginal temporalmente, ya que al cabo de dos horas, los espermatozoides que no han alcanzado el moco cervical, son inmovilizados.

### 2.3.3. Moco cervical

En los seres humanos, el moco cervical es una de las primeras barreras selectivas encontradas por el esperma. El pH de la secreción mucosa cervical es alcalino, permitiendo la supervivencia de los espermatozoides que pueden acceder a él, a los 90 segundos de la eyaculación (Sobrero y cols., 1962). Su influencia en los espermatozoides se realiza de muchas maneras: (1) eliminación de los espermatozoides del ambiente hostil que es la vagina, (2) la eliminación del plasma seminal y la iniciación de la capacitación, (3) la eliminación selectiva de espermatozoides anormales y selección de espermatozoides móviles, (4) de almacenamiento de esperma preservando su fertilidad. El estrecho contacto entre el esperma y el moco cervical, rico en albúmina servirá, en primer lugar, para eliminar los factores decapacitantes como ferritina y, en segundo lugar, a la pérdida de varios lípidos de membrana como el colesterol, dos eventos precoces de la capacitación (Feki y cols., 2004).

Los espermatozoides nadan y migran a través de los poros de la microestructura del moco, que son más pequeños que la cabeza del espermatozoide; por lo tanto, deben abrirse paso empujando (Yudin y

cols., 1989). De hecho, se cree que el moco cervical actúa como filtro, impidiendo el acceso a los espermatozoides anormales y menos capaces (Krzanowska, 1974). La cantidad de espermatozoides en el moco cervical es relativamente constante durante 24 horas después del coito, pero a las 48 horas quedan relativamente pocos (Perloff y cols., 1964). Las contracciones uterinas y la movilidad espermática impulsan los espermatozoides hacia el interior del útero, pudiéndose encontrar espermatozoides en las trompas desde los 5 minutos (Settlage y cols., 1973) a las 80 horas del coito (Gould y cols., 1984).

#### **2.3.4. Útero**

Los espermatozoides remontan rápidamente el cuerpo uterino y llegan a la unión útero-tubarica. En esta región, las secreciones mucosas rellenan su interior, formando una barrera que impide cualquier retroceso. Algunas proteínas de la familia de ADAM, como ADAM1, ADAM2 y ADAM3 expresadas en la superficie de los espermatozoides, parecen necesarias para franquear la unión útero-tubarica (Nishimura y cols., 2004). El esperma de los ratones con genes anulados para ADAM2 es de hecho incapaz de atravesar esta zona y de unirse a la zona pelúcida. Estas moléculas implican la molécula completa de ADAM 3 en este pasaje. A continuación, el esperma se mantendrá más o menos tiempo en la parte inferior del istmo tubarico, que constituye de hecho, un reservorio de esperma.

#### **2.3.5. Trompas de Falopio**

Las trompas proporcionan un entorno propicio para, en primer lugar, el transporte de esperma, el almacenamiento y la capacitación y, en segundo lugar, la captación ovocitaria, su transporte, fertilización y finalmente la división embrionaria. Todos estos acontecimientos se producen en un período relativamente corto de su ciclo menstrual, alrededor de la ovulación.

En las ovejas o vacas, los espermatozoides son almacenados en el período preovulatorio en el istmo caudal, durante, respectivamente, 25-26 y 28-30 horas. Esta parte inferior del oviducto es un reservorio funcional preovulatorio para el esperma de los mamíferos de donde son liberados en el momento de la ovulación. (Hunter, 1981; Bedford y cols., 1994). Los espermatozoides almacenados tienen una mejor morfología que los espermatozoides inseminados (Thomas y cols., 1994), reflejo de la selección que tiene lugar durante el avance por el

interior uterino; la estructura de la cromatina se mantiene intacta. (Ellington y cols., 1998). A pesar de ello, no están plenamente capacitados (Lefebvre y cols., 1996) y mantienen una baja concentración de calcio intracelular y bajos niveles de fosforilación de los residuos de tirosina (Petrunkina y cols., 2001). Aunque hay pruebas de que la mayoría de espermatozoides se sitúan en el líquido de las trompas, varios estudios indican que muchos espermatozoides se unen por la parte apical de su cabeza a las microvellosidades y / o cilios de las células que recubren la endosalpynx. (Lefebvre y cols., 1997). Los azúcares están también implicados en esta interacción espermatozoides/ epitelio del oviducto. Así, en el toro, se ha identificado la fucosa, particularmente en el trisacarido Lewis-a, como un elemento clave de la interacción (Lefebvre y cols., 1997).

Una proteína de los espermatozoides, la PDC-109, de 16kd, secretada por las vesículas seminales y asociada a la membrana plasmática, ha sido identificada como ligando de residuos fucosilados de la superficie del oviducto (Gwathmey y cols., 2003). Al PDC-109 se han sumado otras dos proteínas (recientemente identificadas en ganado), la BSP-30, de 30kd y la BSP-A3, que también promueven la unión de los espermatozoides del epidídimo en el epitelio de las trompas. (Gwathmey y cols., 2006). Estas tres proteínas han sido identificadas como miembros de la familia de las proteínas del plasma seminal (BSP). Otros cuatro miembros de la familia de la anexina (ANXA1, -2, -4, -5) han sido también identificados en el vértice del epitelio de las trompas, como receptores de estas proteínas en el espermatozoide. (Ignotz y cols., 2007). El ANXA1 y ANXA2 están asociados con los cilios de las células epiteliales tubulares. La unión espermatozoide/ epitelio tubarico conserva la fertilidad y la vitalidad de los espermatozoides durante el almacenamiento (Dobronski y cols., 1997). El mantenimiento de una baja concentración de calcio intracelular observado en espermatozoides unidos al epitelio tubarico podría ser el mecanismo que regula la prevención de la capacitación prematura (Dobronski y cols., 1997). La PDC-109 ayuda a estabilizar la membrana de los espermatozoides reduciendo la fluidez de la membrana, reduciendo el movimiento del colesterol dentro de la bicapa lipídica e inhibiendo la fosfolipasa A2 (Greube y cols., 2001; Soubeyrand y cols., 1997). Finalmente, la catalasa, detectada en el fluido del oviducto del ganado, protege las membranas de los espermatozoides contra el estrés oxidativo, preservando así la vitalidad de los gametos (Lapointe y cols., 1998).

Una o dos horas antes de la ovulación, los espermatozoides se reactivan y son progresivamente liberados del epitelio. En los mamíferos, la secuencia de los acontecimientos relacionados con el

almacenamiento de esperma y la liberación gradual durante el periodo peri-ovulatorio, permitiría reducir la incidencia de la poli-espermia. La separación de los espermatozoides en el epitelio de las trompas sería el resultado de la pérdida de los sitios de unión en el epitelio y de cambios funcionales en los espermatozoides. Así, el aumento de glicosaminoglicanos como la heparina en el líquido de las trompas antes de la ovulación, la promoción de la pérdida de la molécula PDC-109 (Gwathmey cols., 2006), o la interferencia en la unión entre el PSB y las anexinas (Shao y cols., 2006) podrían participar en este proceso. Por otra parte, la heparina estimula dos modificaciones intracelulares características de la capacitación, un aumento de calcio intraespermático y la fosforilación de residuos de tirosina de ciertas proteínas en el espermatozoide (Gualtieri y cols., 2005). El incremento de calcio intracelular proviene de la liberación de calcio desde los almacenamientos internos espermáticos y precede a la separación de los espermatozoides en el epitelio de trompas (Gualtieri y cols., 2005). Cambios en el movimiento de los espermatozoides resultantes de estas acciones también podrían facilitar la liberación de los espermatozoides en el epitelio de las trompas. En ratones, el movimiento hiperactivo dota a los espermatozoides de movimientos flagelares rápidos y amplios, lo que les permite moverse entre el moco y avanzar hacia el centro de la luz tubárica (Suarez y cols., 1987). Desde su liberación, los espermatozoides reanudan su capacitación en el interior de las trompas de Falopio, en particular bajo la influencia de bicarbonato. Este ion es un elemento central en el inicio de la capacitación (Wang y cols., 2003). Se secreta en la cavidad uterina, en parte, por el canal CFTR. (Wang y cols., 2003). Su concentración es regulada según las variaciones cíclicas hormonales (Zheng y cols., 2004), y en las trompas, hay un gradiente craneo caudal, siendo su concentración más alta en la unión del istmo/ ampolla que en el propio istmo (Rodríguez-Martínez, 2007). El ascenso de los espermatozoides hacia la ampolla posiblemente implicaría un quimiotáctismo (Eisenbach, 1999). De hecho, existen argumentos para la presencia de diversos factores quimiotácticos en el líquido folicular, secretados por las células del cúmulo que rodean el oocito, al igual que la progesterona. (Oren-Benaroya, 2008), lo que podría explicar la distribución asimétrica de los espermatozoides entre las dos trompas durante la ovulación.

Entre la vagina y la trompa, el número de espermatozoides sufre una importante merma. De un promedio de 200 a 300 millones depositados en la vagina, apenas unos cientos y, con frecuencia, menos, llegan a las cercanías del ovulo. Las cifras más importantes se observan en la región ampular de la trompa en el momento de la ovulación (Willians y cols., 1993). En esta región ampular de la

trompa de Falopio, los espermatozoides adoptan otro patrón de movimiento que se ha llamado *movilidad hiperactiva* (Katz y cols., 1989). Es posible que esta movilidad sea en parte por el resultado de una interacción con el epitelio de la trompa que imprime mayor velocidad y mejor orientación y también impide que los espermatozoides se adhieran y queden atrapados.

## 2.4. TRANSPORTE DEL ÓVULO

En respuesta al pico de LH, se producen en el folículo dos fenómenos paralelos: el reinicio de la meiosis, completándola hasta el estadio de metafase II, y la rotura de las *gap junction* (uniones directas entre la membrana plasmática del ovocito y las células del cúmulo, comunicándolos metabolitamente), que inducen la maduración y la migración de los gránulos corticales hacia la corteza externa del ovocito (Ducibella y cols., 1990). A continuación, el ovocito y la masa de células del cúmulo se preparan para abandonar el ovario separándose de la pared folicular.

Una vez roto el folículo, el ovocito y su cúmulo, se adhieren a la superficie ovárica y las fimbrias de la trompa "barren" el ovario para recogerlo. La entrada en la trompa se facilita mediante movimientos musculares de la trompa, asociada a una moderada presión negativa. Este proceso se realiza lentamente (más de 15 min.) (Gords y cols., 1998).

Las trompas de Falopio están revestidas por un epitelio que, en respuesta a los cambios hormonales del ciclo menstrual, experimenta cambios cíclicos (Amso y cols., 1994). Este epitelio esta compuesto por dos tipos celulares, las células ciliadas y las no ciliadas.

Las células no ciliadas se caracterizan por su importante actividad secretora en la fase folicular del ciclo, que culmina con la liberación de componentes citoplasmáticos durante el paso del ovulo y que quizá provea factores metabólicos necesarios para el transporte y nidación. Las células ciliadas no varían con los cambios hormonales. Los cilios de la superficie de la fimbria tienen lugares de adhesión y se agitan sincrónicamente en dirección al útero, siendo los principales responsables del movimiento inicial del ovulo en la trompa. Este movimiento depende de la presencia del cúmulo folicular que rodea al ovocito. El transporte del ovulo comprende el periodo desde la

ovulación hasta la entrada de la mórula en el útero, proceso en el que se invierten 80 horas.

## **2.5. CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA Y FERTILIZACIÓN**

Se desconoce durante cuanto tiempo mantiene el ovocito y el espermatozoide humano la capacidad de ser fertilizado, aunque se estima entre 12-24 horas para el ovocito y 48-72 horas para el espermatozoide. El contacto entre ambos gametos ocurre en la región ampular de la trompa y existen algunas pruebas de comunicación entre ambos que atraen al espermatozoide hacia el ovulo (Ralt y cols., 1991; Eisenbanch y cols., 1992). El espermatozoide adquiere esta capacidad quimiotáctica después de completar el proceso denominado capacitación (Cohen-Dayag y cols., 1995).

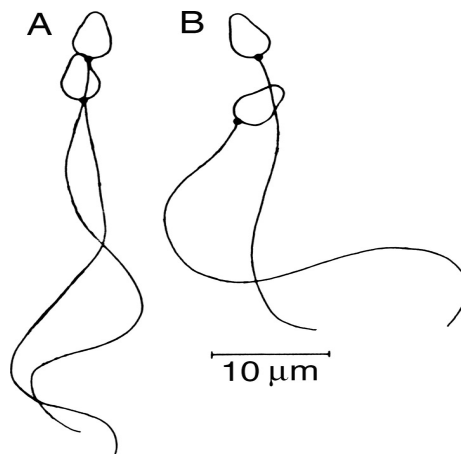
Se denomina capacitación espermática al conjunto de cambios fisiológicos que deben experimentar los espermatozoides eyaculados para ser capaces de fertilizar al ovulo (Zaneveld y cols., 1991). Durante este proceso, realizado en el interior del aparato genital femenino, el espermatozoide adquiere 3 características:

1. Movilidad hiperactiva
2. Capacidad de unión a la zona pelúcida
3. La reacción acrosómica

### **2.5.1. Movilidad hiperactiva**

En 1970, Yanagimachi informó de que los espermatozoides de hámster adquieren un tipo de movimiento denominado "hiperactivo" y propuso que este tipo de movilidad era necesario para que los espermatozoides alcanzaran el ovocito y/o atravesaran el cúmulo y la zona pelúcida (Yanagimachi, 1970). Este movimiento induce a su vez movimientos más amplios y asimétricos del flagelo, así como un movimiento constante de rotación de la cabeza del espermatozoide (Morales y cols., 1988). El comportamiento de los espermatozoides con movimiento hiperactivo, no ha sido observado aun en el oviducto humano, por lo que los datos provienen fundamentalmente de observaciones *in Vitro* y de experimentación animal.





**FIGURA 8.-** Patrones flagelares de actividad (A) e hiperactividad (B) espermática (Morales y cols., 1988).

Los espermatozoides, al entrar en el oviducto, encuentran una secreción mucosa espesa en la unión útero-tubarica y en el istmo, en la fase folicular tardía (Jansen, 1980), debiendo desplazarse en un medio con aumento de la viscosidad y elasticidad. Se ha observado *in Vitro* que los espermatozoides de animales como el jabalí y el hámster solo pueden desplazarse adecuadamente en un medio viscoso cuando adquieren hipermovilidad (Suarez y cols., 1992). Este tipo de movimiento hiperactivo es necesario para optimizar el desplazamiento de los espermatozoides a través de la secreción mucosa del oviducto y para facilitar la penetración del cúmulo ovocitario ya que, debido a la presencia de ácido hialurónico, es altamente viscoelástico (Kim y cols., 2005). Hay pruebas sólidas de que la hiperactivación es necesaria para penetrar la zona pelúcida. En el Hámster, el bloqueo de los canales de  $Ca^{2+}$  inhibe la hipermovilidad de los espermatozoides adheridos a la zona pelúcida, produciéndose la Reacción Acrosómica, pero son incapaces de penetrar la zona pelúcida de los ovocitos (Stauss y cols., 1995). La eliminación de la zona pelúcida, permite la fertilización (Quill y cols., 2003). (Figura 8)

### 2.5.1.1. Unión al epitelio tubárico

En muchas especies de mamíferos, existe un depósito de espermatozoides en el istmo del oviducto donde se produce su unión con el epitelio de la mucosa tubarica (Suárez y cols., 2006), lo que prolonga su vida móvil (Gwathmey y cols., 2003). En algunas especies, esta interacción se produce por la unión específica de las

proteínas de superficie del espermatozoide a un receptor glucosilado en el epitelio tubarico (Suárez y cols., 2006). Esta unión se debilita según el espermatozoide va completando la capacitación. Esta pérdida de fijación al epitelio, junto con el movimiento hiperactivo, facilita el acceso del espermatozoide a la luz tubarica (Gwathmey y cols., 2003; DeMott, y cols., 1992).

Diversos experimentos *in Vitro* han apreciado que los espermatozoides desprendidos del epitelio tubarico tenían una mayor incidencia de movimiento hiperactivo que los espermatozoides que aun no habían conectado el endosalpinx (Pacey y cols., 1995), lo que indica que la hiperactivación puede ser necesaria para desprender el esperma humano del epitelio y / o que la unión del epitelio produzca la hiperactivación espermática.

### **2.5.1.2. Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ )**

$\text{Ca}^{2+}$  es el segundo mensajero primordial que desencadena la movilidad hiperactiva. El  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aumenta durante la estimulación de la hiperactivación (Xia y cols., 2007; Ho y cols., 2001).

En espermatozoides desmembrados, donde solo queda intacto el núcleo, el citoesqueleto y sus proteínas, no existe movimiento. La transferencia a un medio rico en  $\text{Ca}^{2+}$  reactiva el movimiento flagelar, lo que indica que el  $\text{Ca}^{2+}$  afecta a la axonema directamente (Ho y cols., 2002) en lugar de a través de otras estructuras esqueléticas. La regulación selectiva de la actividad de un grupo de fibras de dineína por elevadas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  se demostró que era la base de los cambios en los patrones flagelares en el esperma desmembrado del erizo de mar (Bannai, y cols, 2000). De hecho, espermatozoides humanos han sido reactivados con éxito después de la desmembración (Murad y cols., 1992).

Han sido espermatozoides desmembrados los que se han utilizado para identificar la vía de la señal del  $\text{Ca}^{2+}$ , habiéndose observado en experimentación animal que la hiperactivación es desencadenada por la vía  $\text{Ca}^{2+}$ /CAM con activación de CaMKII (Ignatz y cols., 2005; Schlingmann y cols., 2007). En el esperma humano, no se ha observado una inhibición específica de la hiperactividad frente a los inhibidores de CAM, siendo por ello necesarias investigaciones adicionales sobre el papel de las quinasas CAM en la regulación de la motilidad de los espermatozoides humanos y en la hiperactivación.

### 2.5.1.3. Canales de membrana

#### a. Canales CatSper

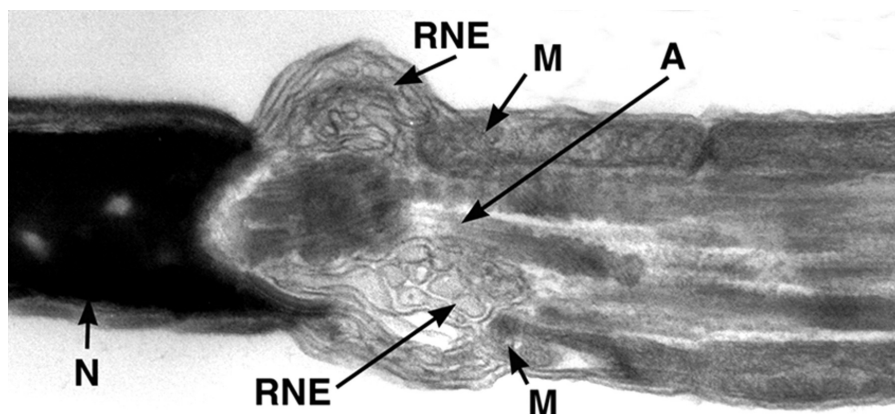
El  $\text{Ca}^{2+}$  pueden provenir de dos fuentes: 1) extracelular introducido a través de canales de la membrana plasmática y / o 2)  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en orgánulos intracelulares. La fuente predominante de  $\text{Ca}^{2+}$  para la hiperactivación es extracelular, incorporándose a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática formados por proteínas CatSper (Kirichok y cols., 2006). Estas proteínas sólo se expresan en células germinales masculinas y se localizan en la pieza principal del flagelo del espermatozoide maduro (Jin y cols., 2007). Estos canales parecen ser activados mediante el aumento intracelular pH (Kirichok y cols., 2006). Los ratones mutantes con ausencia de genes para CatSper-1, -2, -3 y -4 son estériles y la infertilidad ha sido correlacionado con la falta de hiperactividad (Qi y cols., 2007; Jin y cols., 2007), posiblemente por no poder mantener niveles críticos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

Homólogos a los genes murinos CatSper han sido identificados en el genoma humano. Las transcripciones de los genes CatSper fueron detectadas en cantidades más altas en muestras de semen con alta motilidad que aquellos con baja motilidad de los espermatozoides (Li y cols., 2007). En un reciente estudio, se observó que la expresión de CatSper fue menor en los pacientes subfértiles cuyo esperma mostraba déficit de movilidad que en los pacientes subfértiles cuyo esperma mostraba movilidad normal (Nikpoor y cols., 2004).

Además de las fuentes extracelulares, el  $\text{Ca}^{2+}$  para la hiperactivación pueden ser proporcionado por un orgánulo de almacenamiento en la base de la flagelo. Diversos agentes farmacológicos utilizados habitualmente para liberar  $\text{Ca}^{2+}$  desde almacenamientos intracelulares, pueden inducir hiperactivación en el esperma de toro, incluso en ausencia de calcio extracelular (Ho y cols., 2001). El denominado RNE es un racimo de vesículas de membrana que se origina de la envoltura nuclear durante la condensación del núcleo durante la espermiogénesis (Toshimori y cols., 1985; Franklin, 1968). A diferencia de otros orgánulos, el RNE no es descartado en el citoplasma residual, siendo esto probablemente debido a que su función es precisamente almacenar  $\text{Ca}^{2+}$  (Harper y cols., 2005).

También se ha identificado al acrosoma como un reservorio de  $\text{Ca}^{2+}$  en el esperma de los mamíferos (Herrick y cols, 2005), incluido el esperma humano (Bedu-Addo y cols, 2007), siendo posible que el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado desde este almacenamiento contribuya de alguna manera a la hiperactivación.

Los canales CatSper se limitan a la pieza principal del flagelo, mientras que el RNE se encuentra en estrecha asociación a las mitocondrias de la base de la pieza intermedia. (Figura 9) No se sabe si el  $\text{Ca}^{2+}$  para la hiperactivación proviene normalmente de ambas vías (RNE y canales CatSper) o si el procedente de RNE sirve para modular la motilidad hiperactivación.



**FIGURA 9.-** Micrografía electrónica de espermatozoide de toro mostrando la envoltura nuclear redundante. N: Núcleo; M: Mitocondria; RNE: envoltura nuclear redundante; A: Axonema (Chen Ho, 2001).

### **b. Canales KSper**

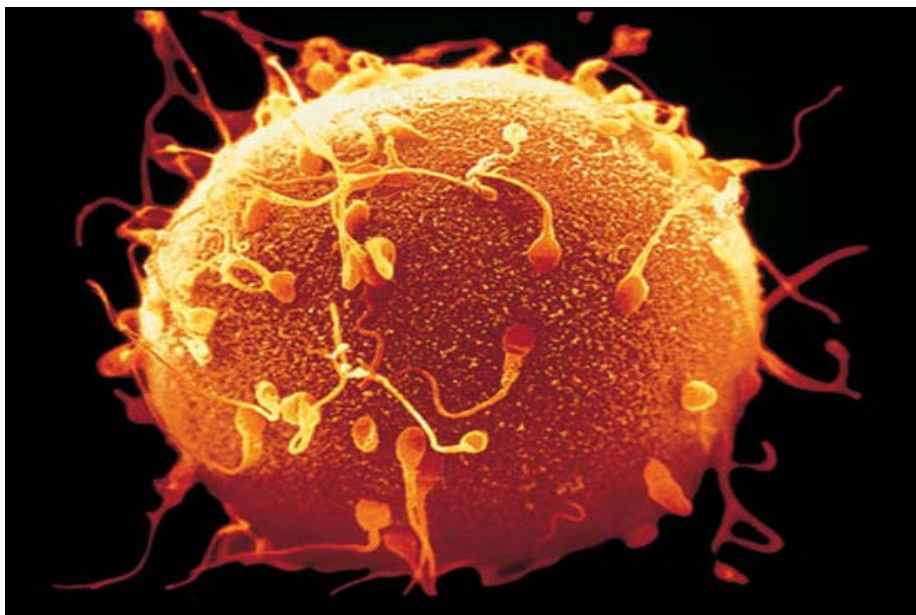
Un nuevo canal, denominado KSper, ha sido detectado en el espermatozoide de ratón, habiéndose propuesto que es causado por un gen específico del testículo denominado *mSlo3* (Navarro y cols. 2007). La salida de  $\text{K}^+$  a través de este canal hiperpolariza la membrana plasmática y, al hacerlo, aumenta la fuerza motriz para el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales CatSper. Al igual que la actividad CatSper, la KSper es estimulada por un pH alcalino, por lo tanto, la salida de  $\text{H}^+$  de los flagelos pueden afectar a la afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  directamente a través de Canales de CatSper e indirectamente a través de la activación de KSper con corrientes de  $\text{K}^+$  (Navarro y cols., 2007).

### **c. ATP y pH**

Por último, la hiperactivación requiere también de niveles adecuados de ATP (Ho y cols., 2002) así como un pH de 7.9-8.5, ya que los canales CatSper se activan ante un pH intracelular alcalino. (Kirichok y cols., 2006).

Lamentablemente, la activación fisiológica que desencadena la hiperactivación *in vivo* sigue siendo difícil de conocer casi 40 años después de la primera referencia realizada por Yanagimachi (1970) La hiperactivación debe producirse siempre en el lugar y momento adecuados para lograr la fertilización. Hay pruebas de que los espermatozoides hiperactivos no pueden atravesar la unión uterotubal (Gaddum-Rosse, 1981), por lo que el oviducto es el mejor lugar para buscar moléculas de activación. Los activadores podrán ser secretados por el epitelio del oviducto o introducidos en el oviducto por la masa de ovocito + el cúmulo, teniendo en cuenta que las hormonas, iones y secreciones de la luz del oviducto varían durante el ciclo ovárico (Nichol y cols., 1992). Sin embargo, todavía no han sido claramente identificadas las señales específicas que participan en este proceso.

Por motivos tanto éticos como técnicos, la movilidad hiperactiva del espermatozoide humano no ha sido observada *in vivo*, dependiendo los conocimientos actuales de la información facilitada a través de estudios en modelos animales. Solo ha sido observada esta movilidad *in Vitro*, al incubarlos en medios de capacitación (Morales y cols., 1988; Mortimer y Mortimer, 1990; Mortimer y Swan, 1995), posibilitando la fecundación extracorpórea. Estos medios de cultivos deben ser soluciones salinas equilibradas que contengan sustratos energéticos como lactato, piruvato y glucosa, una proteína como la albúmina o un líquido biológico, como suero o líquido folicular. Las técnicas de lavado espermático probablemente eliminan factores que cubren la superficie del espermatozoide, uno de los pasos iniciales de la capacitación. Se cree que la remoción del colesterol de la membrana espermática lo prepara para la reacción acrosómica (Ravnik y cols., 1992). La pérdida de colesterol regula la expresión de las lecitinas de la superficie de la membrana celular, implicadas en los receptores de superficie espermática que identifican la zona pelúcida. (Benoff y cols., 1993). La capacitación *in Vitro* requiere aproximadamente 2 horas (Overstreet y cols., 1980).



**FIGURA 10.-** Espermatozoides adheridos al óvulo

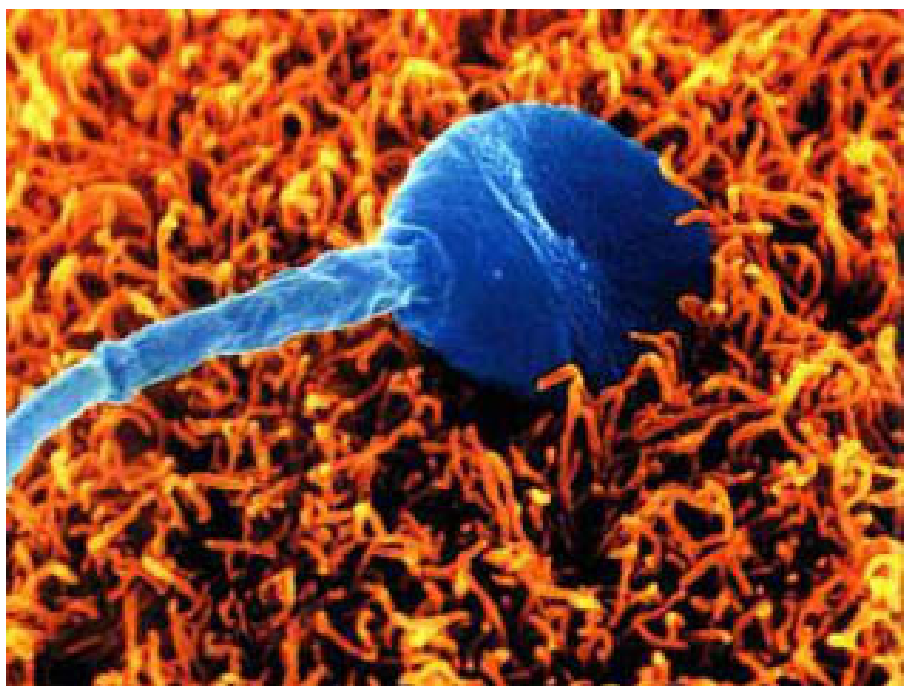
Cuando el esperma humano se incuba en un medio de capacitación, un promedio de de 10-20% desarrollan patrones de movilidad que se parecen a la hiperactivación (Burkman, 1984; Buffone y cols., 2005). El esperma de los hombres fértiles muestran niveles más altos de hiperactivación (~12%) que los espermatozoides de pacientes infértiles astenozoospermicos (~4%) (Buffone y cols., 2005). Sin embargo, los niveles mostrados por la muestras normales son tan bajos que no podemos estar seguros de que el medio de incubación para la capacitación sea el medio óptimo de hiperestimulación para el esperma humano, o si otros factores juegan un papel estimulante en la hiperestimulación espermática *in vivo*.

### **2.5.2. Capacidad de unión a la zona pelucida**

La expansión del cúmulo ooforo que rodea al ovocito, puede facilitar el encuentro con los espermatozoides al ampliar la superficie de contacto en la ampolla tubarica y además pueden facilitar el paso del espermatozoide sin que se liberen las enzimas proteolíticas del acrosoma (Talbot, 1985).

La zona pelucida rodea al ovulo hasta la implantación. Contiene receptores para los espermatozoides específicos para cada especie y

efectúa una reacción posterior a la penetración del espermatozoide, que impide la poliploidia. La zona pelúcida es una estructura porosa (a causa de las muchas glucoproteínas reunidas en filamentos largos interconectados) sobre la que se establece una fuerte unión de los espermatozoides capacitados. Este paso es un requisito para la penetración del ovocito, que se consigue gracias a la movilidad activa de la cola y de la cabeza del espermatozoide en un movimiento similar al de una guadaña (Bedford, 1994) (Figuras 10 y 11)



**FIGURA 11.-** Espermatozoide introduciéndose en el óvulo.

Inicialmente, para que el espermatozoide se una a la zona pelúcida es necesario que reconozca el componente carbohidrato de la molécula fijadora de las glucoproteínas específicas de la especie (Wassaeman, 1992). Después de la unión, el componente peptídico de la glucoproteína receptora desencadena la reacción acrosómica. Por lo menos uno de los receptores de la cabeza del espermatozoide es una tirosinquinasa activada por la unión a la glicoproteína ZP3 (Leyton y cols., 1992; Burks y cols., 1995). Es decir en el reconocimiento del fijador de la zona del ovocito interviene una enzima de la superficie del espermatozoide que queda expuesto en el proceso de capacitación.

### **2.5.3. Reacción acrosómica.**

*La reacción acrosómica* (Yanagimachi, 1990) permite la salida de los contenidos enzimáticos proteolíticos del acrosoma, la estructura en forma de capuchón que cubre el núcleo espermático. Durante este proceso se modifican las características superficiales del espermatozoide al eliminar los factores plasmáticos seminales que lo recubren, modificarse su carga y restringir la movilidad de los receptores. Todo ello se asocia a modificaciones de los esteroides, lípidos y glucoproteínas de la membrana celular del espermatozoide, produciendo una disminución de la estabilidad de la membrana plasmática y de la inmediatamente subyacente: la membrana externa del acrosoma. Cuando los espermatozoides capacitados llegan a las cercanías de un ovocito, se produce una rotura y fusión de ambas membranas permitiendo la salida del contenido enzimático compuesto por hialuronidasa, factor tipo neuromidasa y una proteasa llamada acrosina que intervienen en la penetración del revestimiento del ovulo por el espermatozoide.. La membrana que se fusiona con la membrana plasmática del ovocito es la membrana interna del acrosoma.

La reacción acrosómica, con la liberación de las enzimas proteolíticas, requiere un receptor de glucoproteínas espermáticas específico situado en la zona pelucida. La zona pelucida esta compuesta por glucoproteínas segregadas por el ovocito, llamadas ZP1, ZP2, y ZP3, de las cuales la mas abundante es la ZP3 y es el principal fijador del espermatozoide (Shabanowitz y cols., 1988). La similitud de la secuencia del ADN del ZP3 en distintos mamíferos, indica que este gen se ha conservado en la evolución y que la interacción espermatozoide-fijador, es un mecanismo común a todos los mamíferos (Dean, 1988). La unión con ZP2 se produce después de la reacción acrosómica e interviene en la reacción de la zona para prevenir la polispermia. Probablemente, después de la fertilización se produce la desactivación de estos fijadores por acción de una o mas enzimas del granulo cortical.

La cabeza del espermatozoide también posee el sistema de señales de la proteína G. Su activación abre los canales de calcio para aumentar los niveles intracelulares de dichos iones, un requisito necesario para la reacción acrosómica (Florman y cols., 1989; Ward y cols., 1994). Por lo tanto, la interacción inicial entre el espermatozoide y la zona depende de la unión de espermatozoides con el acrosoma intacto, seguida de un proceso mediado por una enzima liberada por la reacción acrosómica, inducida a su vez por la zona.



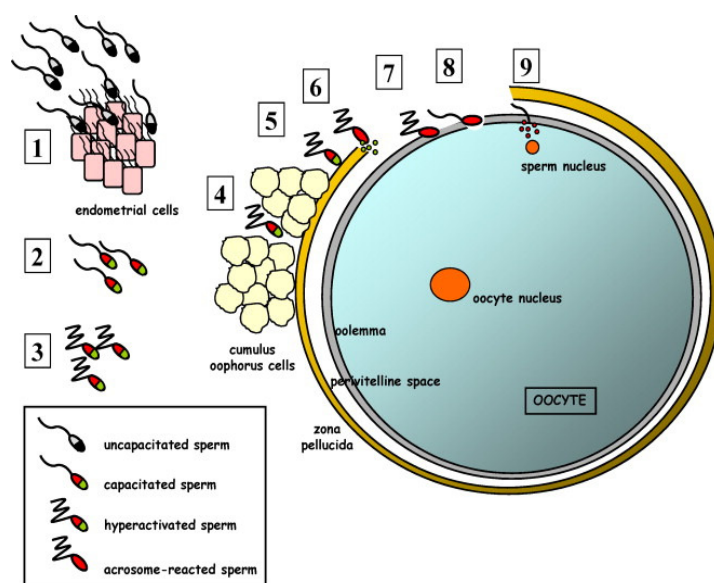
Los espermatozoides entran en el espacio perivitelino por un ángulo. El ovocito es una célula esférica cubierta por microvellosidades. La cabeza del espermatozoide es como un plato llano, un poco menos grueso que la distancia entre las microvellosidades del ovocito (Green, 1993). La región del segmento ecuatorial de la cabeza del espermatozoide es decir, la porción distal del acrosoma, es la primera que entra en contacto con la membrana vitelina (la membrana plasmática del ovulo u oolema). Inicialmente la membrana del ovulo rodea la cabeza del espermatozoide, y luego, las membranas del ovulo y del espermatozoide se fusionan. Esta fusión es mediada por proteínas específicas. Se ha logrado determinar la secuencia de dos proteínas de la membrana de la cabeza del espermatozoide; una de ellas (PH-20) interviene en la unión con la zona pelucida y la otra (PH-30, también llamada fertilina) participa en la fusión con el ovocito (Lathop y cols., 1990; Blobel y cols., 1992). La PH-20, con actividad hialuronidasa, también interviene en la dispersión del cúmulo (Lin y cols., 1994). La membrana celular del ovocito no fertilizado contiene moléculas de adhesión - fusión de integrina, que reconocen péptidos, como la fibronectina, la laminilla y el colágeno (Fusi y cols., 1996).

Después de la fusión de las membranas del ovocito, tiene lugar la reacción cortical y la activación metabólica del ovocito. En el momento de la fertilización, estas reacciones están precedidas por un aumento del calcio intracelular libre en un patrón periódico, oscilatorio y se cree que este es el mecanismo mediante el cual el espermatozoide desencadena estos procesos de desarrollo (Taylor y cols., 1993; Swann, 1996). Se ha identificado una proteína soluble, llamada oscilina, en el segmento ecuatorial de la cabeza del espermatozoide que puede ser el elemento que emite las señales para las indispensables oscilaciones del calcio (Sousa y cols., 1996; Parrington y cols., 1996).

El inicio del bloqueo a la penetración de la zona (y el vitelo) por parte de otros espermatozoide es mediado por la reacción cortical, otro ejemplo de exocitosis con liberación de materiales de los gránulos corticales, organelas tipo liposomas que se hallan justo debajo de la superficie del ovulo (Barros y cols., 1971). Como ocurre con otros orgánulos tipo liposomas, estos materiales incluyen diferentes enzimas hidrolíticos. Los cambios que producen estas enzimas provocan la reacción de zona, el refuerzo de la capa extracelular por entrecruzamiento de las proteínas estructurales y la desactivación de los fijadores para los receptores de espermatozoides (Sathananthan y cols., 1982). En consecuencia se produce el bloqueo de la zona y se impide la polispermia. El cambio inicial en este bloqueo es una rápida

despolimerización de la membrana del ovocito, asociada con la liberación de iones de calcio de la calmodulina. El aumento de calcio intracelular actúa como una señal o desencadenante, para activar la síntesis de proteínas en el ovocito. La despolarización de la membrana inicia solo un bloqueo transitorio de la entrada de espermatozoides. El bloqueo permanente es una consecuencia de la reacción cortical y la liberación de enzimas, que aparentemente también se desencadenan por un aumento del calcio.

Aproximadamente 3 horas después de la inseminación, se completa la meiosis (Lobata y cols., 1980). El segundo cuerpo polar es liberado y abandona el ovulo con un componente haploide de cromosomas. El agregado de cromosomas provenientes del espermatozoide restablece la dotación diploide en el ovulo ahora fertilizado. El material cromatinico de la cabeza del espermatozoide se descondensa y se forma el pronúcleo masculino. Los pronúcleos masculino y femenino migran para encontrarse y cuando están muy próximos, las membranas limitantes se rompen, formándose un huso en el cual se distribuyen los cromosomas. De este modo queda preparado el terreno para la primera división celular. (Figuras 12 y 13).



**FIGURA 12.-** Fases de activación espermática necesarias para la fertilización: Durante su tránsito por el aparato genital femenino, el espermatozoide debe someterse a una secuencia de eventos que les confieren su capacidad fertilizante. (1) Interacción con las células endometriales, (2) Capacitación, (3) hiperactivación, (4) penetración de las células de la granulosa, (5) unión a la zona pelúcida, (6) Reacción del acrosoma, (7) Unión al oolema, (8) Fusión de las membranas plasmáticas del espermatozoide y del ovocito, (9) Introducción del núcleo del espermatozoide en el ovocito

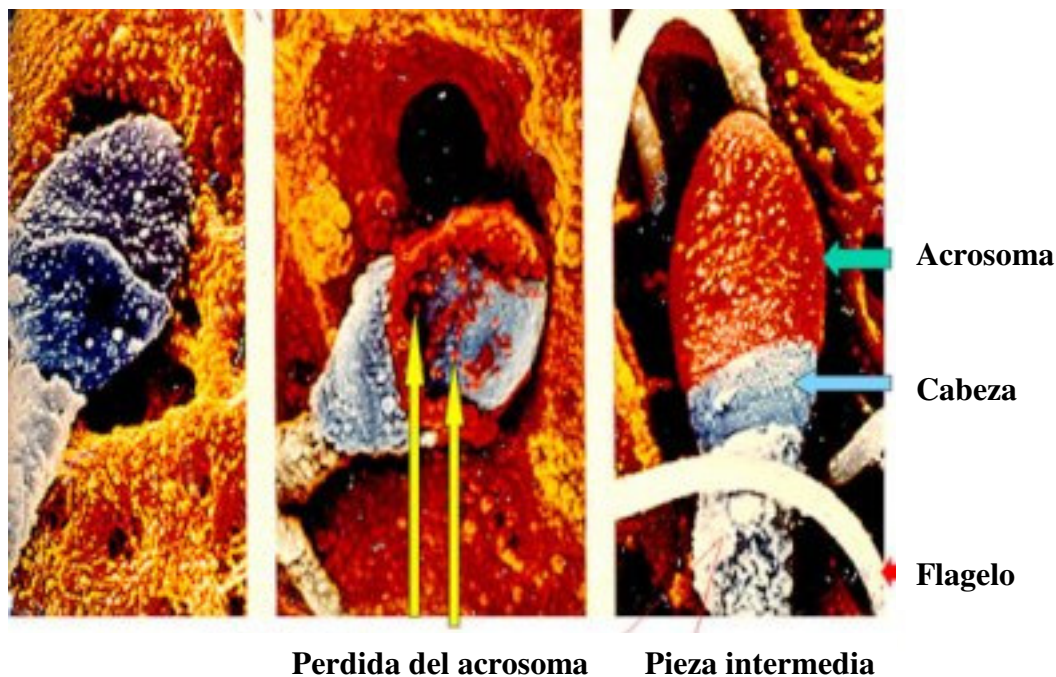


FIGURA 13.- Reacción acrosómica

### 3. ESTUDIO DE LA FERTILIDAD MASCULINA

Una de cada seis parejas es estéril. Este problema afecta a 80 millones de parejas en todo el mundo, estando el factor masculino presente en el 50% de ellas. Es más, uno de cada 20 hombres presenta alteraciones seminales (Boivin y cols., 2007). Se trata como vemos de una alta proporción de la población en comparación con otras enfermedades prevalentes como la diabetes (2,8% de la de la población) (Wild y cols., 2004). Por lo tanto, la subfertilidad masculina es un problema mundial muy importante y, lo más preocupante es que los informes recientes sugieren que su prevalencia está en aumento (Sharpe&Irving, 2004).

Desafortunadamente, no se dispone de tratamientos para la disfunción del esperma, excepto para aquellos que simplemente acercan los espermatozoides al óvulo. La única opción de tratamiento real para el hombre es la concepción asistida (denominados colectivamente tecnología de reproducción asistida o ART).

El desarrollo de una terapia eficaz para tratar la disfunción espermática requiere una clara comprensión de los mecanismos

genéticos, moleculares y celulares de la espermatogénesis) y del funcionamiento del espermatozoide normal. Sin embargo, hasta hace poco, el progreso ha sido dolorosamente lento. La mayoría de nuestros conocimientos se basan y en la experimentación animal y en los resultados reproductivos obtenidos por las técnicas de Reproducción Asistida, asociadas a Parámetros analíticos desarrollados con un objetivo pronóstico.

### **3.1. Parámetros seminales**

La calidad del semen se utiliza con frecuencia como una medida indirecta de la fertilidad masculina, sin embargo, la fecundidad de una muestra de espermatozoides dado no puede ser "a priori" establecida con certeza (Guzick y cols., 2001). Los criterios convencionales establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), utilizando los parámetros del semen Estándar (SSP) en concentración, movilidad y morfología espermática permite la separación de las muestras de semen en normales o "de referencia" y valores anormales (WHO, 1999). La mayor crítica a los criterios de la OMS es su incapacidad para determinar la capacidad fecundante del semen analizado así como una coincidencia significativa entre los parámetros del semen de los hombres estériles y fértiles (Tomlinson, 1999).

Actualmente, la medida de la movilidad espermática es uno de los parámetros más utilizado para determinar la fertilidad masculina. El desarrollo de la capacidad fecundante y la movilidad ocurren de forma paralela, de ahí que se haya utilizado como medida indirecta de la capacidad de una población de espermatozoides para fecundar (Álvarez, 2003; Holland-Moritz y Krause 1992). Debido a ello, la movilidad espermática es considerada una de las funciones clave para el control reproductivo; mejorando la movilidad espermática en casos de escaso éxito reproductivo o reduciendo la movilidad en busca de anticonceptivos masculinos (Quill y cols., 2006).

El examen seminal que se realiza en la clínica se llama seminograma. En él se analiza la movilidad, la mortalidad, la concentración y la morfología de los espermatozoides y el pH, el volumen, la concentración de leucocitos y el número de agregados presentes en la muestra seminal. Por tanto, en la actualidad la movilidad que se determina clínicamente corresponde a la movilidad activada. Todavía no hay métodos muy fiables que determinen la

movilidad hiperactiva, siendo por ello que no sea un parámetro a analizar en muestras clínicas (Turner, 2006).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1999), se diferencian cuatro tipos de espermatozoides en base a su velocidad. *Movilidad tipo "a"*: espermatozoides rápidos progresivos, *movilidad tipo "b"*: espermatozoides lentos y/o zigzagueantes progresivos, *movilidad tipo "e"*: espermatozoides no progresivos y *movilidad tipo "d"*: espermatozoides inmóviles. Además, se ha definido la movilidad progresiva, es decir, la suma de los espermatozoides con movilidad tipo "a" y "b" puesto que éste es uno de los parámetros que se correlaciona con la calidad seminal.

La OMS (WHO, 1999) determina los parámetros de normalidad seminal, estableciendo que los sémenes que cumplen todos los parámetros se consideraban normales o normozoospermicos. La alteración de uno de los parámetros establece la anormalidad seminal:

*Astenozoospermia*: menos de 25% de espermatozoides tipo a, o con menos de 50% de espermatozoides a+b.

*Oligozoospermia*: Concentraciones < 20 mill/ml y/o 40 millones en el recuento total

*Teratozoospermia*: Presencia de < 15% de formas normales

*Necrozoospermia*: > de 50% de espermatozoides muertos

*Azoospermia*: Ausencia de espermatozoides

*Aspermia*: Ausencia de eyaculado

## **3.2. Pruebas de funcionalidad espermática**

### **3.2.1. Interacción seminal con ovocitos humanos**

Su objetivo es establecer la capacidad fertilizante del semen, independientemente de sus valores seminales. Estableciendo la capacidad de unión del espermatozoide con la zona pelucida (Sperm-ZP binding tests) o induciendo la reacción acrosómica (Human ZP-induced AR test). Todos ellos precisan de ovocitos humanos

provenientes de ciclos de Fertilización *in Vitro*. Estos ovocitos son desechados del uso reproductor por inmadurez o bien por fallo en la fertilización (Liu y cols., 2004).

Su uso no se ha generalizado por varios motivos: dificultades en la obtención de óvulos, laboriosidad técnica y discrepancias en los resultados, quizá debidas al uso de ovocitos de baja calidad (inmaduros o no fertilizados). La sustitución de ovocitos por preparados comerciales de ZP recombinante no han tenido aceptación ya que la mayoría de los productos no son activos en la inducción de la AR test.

#### **a. Sperm-ZP binding tests** *Sperm-ZP binding ratio test:*

- Este test esta basado en la unión competitiva del mismo grupo de ovocitos por dos poblaciones de espermatozoides teñidos con diferentes fluorocromos. Un contaje menor de 40 millones de espermatozoides unidos a la ZP es considerado anormal (Lyu y cols., 2004).
- *HZAL* Se realiza la incubación por separado de las dos muestras seminales (estudio y control), pero utilizando los mismos ovocitos que previamente has sido hemiseccionados (Burkman y cols., 1988).

#### **b. Human ZP-induced AR test**

Tras la incubación, se desprenden del ovocito los espermatozoides adheridos a la ZP y se observa la presencia de la reacción acrosómica mediante tinción con isotiocianato de fluoresceína. (Lyu y cols., 1996). *Sperm-zp penetration test:* Determina la proporción de espermatozoides que penetran la ZP. Valores > 20% determinan normalidad funcional del espermatozoide (Lyu y cols., 1996).

#### **c. Sperm-oolemma binding ratio test**

Valora la proporción de espermatozoides unidos al ovocito libre de su zona pelucida (oolema) (Lyu y cols., 1990).

### **3.2.2. Test de integridad de membranas espermáticas**

**Host test:** Valora la integridad funcional de membrana colocando los espermatozoides en un medio hipo-osmótico, que produce su

hinchazón. Se correlaciona con la capacidad fertilizante de los espermatozoides en Fertilización *in Vitro*. Es una prueba sencilla, que se utiliza como complemento del estudio seminal (Jeyendran y cols., 1984).

### **3.3 Estudios Genómicos**

#### **3.3.1. Fragmentación del DNA espermático**

En los últimos años, se ha desarrollado un interés creciente sobre la integridad del ADN espermático. Valores elevados de fragmentación del ADN han sido correlacionados con infertilidad, el desarrollo embrionario defectuoso, fallo de implantación y mayor riesgo de abortos involuntarios recurrentes (Spano y cols., 2000; Benchaib y cols., 2007; Bungum y cols., 2007). La integridad del genoma paterno es de vital importancia en el inicio y mantenimiento de un embarazo. Los espermatozoides con el DNA dañado, pueden fecundar ovocitos con la misma eficacia que los intactos (Aitken y cols., 1998), pero salvo que el ovocito repare el defecto, el embrión es incompatible con el desarrollo normal

La fragmentación del DNA espermático se clasifica en (Evenson y cols., 2002): Leve: <15%; Moderado: 15-30%; y Grave: >30%, asociándose a un pronóstico reproductivo bueno, moderado y malo respectivamente

La fragmentación del DNA espermático, esta asociado a alteraciones de los parámetros seminales, observándose valores > 30% en el 9% de los sémenes que presentaban una alteración, el 20% en los que presentaban 2 y el 29% en los oligo-asteno-teratozoospermicos. Cuando el semen es normal, una alteración grave de la fragmentación se observo en el 0.5% de las muestras (Sergey y cols., 2009), pero aumentaba a un 43% si el semen normozoospermico procedía de una pareja estéril (Saleh y cols., 2002). Se ha observado un aumento de la fragmentación del DNA, asociado a la edad (Wyrobek y cols., 2006).

La fragmentación del DNA espermático puede producirse a nivel testicular o post-testicular. Alteraciones durante la espermatogénesis podrían ocasionar defectos en el remodelado de la cromatina y fragmentación del ADN espermático. Una elevada producción de formas ROS producidas por espermatozoides inmóviles, anormales morfológica y funcionalmente, así como una reducción de la capacidad

antioxidante del plasma seminal son posibles causas del daño en el DNA a nivel post-testicular (Irvine y cols., 2000; Moskovtsev y cols., 2007).

Es posible que el estudio de la fragmentación espermática sea mejor discriminador que los parámetros seminales clásicos en el estudio del varón estéril.

### **3.3.2. Estudio de anomalías cromosómicas en espermatozoides mediante FISH**

La hibridación *in situ* con sondas de ADN fluorescente (FISH) en espermatozoides permite obtener datos fidedignos sobre la frecuencia de anomalías cromosómicas en los espermatozoides y ofrecen una valiosa información sobre el pronóstico reproductivo.

La literatura disponible sobre el análisis FISH de los espermatozoides humanos confirma mayores tasas de aneuploidía de esperma en hombres infértiles, en comparación con los hombres fértiles, a pesar de un cariotipo normal de la sangre (Moosani y cols., 1995; Lähdetie y cols., 1997; Bernardini y cols., 1998; Arán y cols., 1999; Pang y cols., 1999; Pfeffer y cols., 1999; Rives y cols., 1999; Ushijima y cols., 2000; Vegetti y cols., 2000; Martin y cols., 2003). De hecho, ha sido ampliamente descrita una correlación inversa entre la calidad del esperma y las tasas de aneuploidía espermática (Bernardini y cols., 2000; Nishikawa y cols., 2000; Ushijima y cols., 2000; Vegetti y cols., 2000; Rubio y cols., 2001), así como una relación inversa entre aneuploidía espermática y concentración de espermatozoides (Pang y cols., 1999; Vegetti y cols., 2000; Calogero y cols., 2001; Rubio y cols., 2001) y entre aneuploidía espermática y motilidad de los espermatozoides (Vegetti y cols., 2000). Los pacientes con oligo-asteno-teratozoospermia tienen una mayor tasa de aneuploidias y diploidias en sus espermatozoides (Durakbasi Dursun-HG, y cols., 2008).

### **3.3.3. Anomalías meióticas en biopsia testicular**

La evaluación de la meiosis en biopsia de tejido testicular de pacientes infértiles, permite observar una incidencia 2.5 veces superior de anomalías meióticas y sinápticas que en la población fértil. La afectación se relaciona directamente con la concentración espermática,



observando una incidencia 5-6 veces mayor de anomalías en recuentos seminales inferiores a  $0.5 \times 10^6/\text{ml}$  (Barri, y cols., 2005). Estas anomalías no afectan la fertilización y dimisión de los cigotos, pero pueden generar embriones con anomalías cromosómicas de mal pronóstico reproductivo (Martin, 2006).

#### **4. INSEMINACIÓN INTRAUTERINA**

Clínicamente la esterilidad se define como "la incapacidad de concebir después de al menos 1 año sin protección de coito". Se estima que afecta al 10% de las parejas en edad reproductiva, pero en los últimos años se ha producido un aumento de su incidencia, debido a la aparición de una esterilidad de causa social, que retrasa el deseo gestacional hacia edades que implican un declive natural de la fertilidad, alcanzando el problema al 15% de la población.

Se define la ART como los tratamientos o procedimientos que incluyen la manipulación *in Vitro* de ovocitos, espermatozoides y/o embriones humanos con fines reproductivos (Zegers-Hochschild, 2010). Incluyen procedimientos como la Fertilización in Vitro (FIV), la Microinyección Espermática (ICSI), el Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP), la Inseminación Intrauterina (IAC) y la donación de gametos (óvulos y/o espermatozoides).

Las técnicas de Reproducción asistida contribuyen al 6.2% de los nacimientos europeos (Nyboe Andersen, 2006), habiéndose realizado 418.111 ciclos en Europa durante el año 2005, lo que supone una demanda anual de 1115 ciclos /millón de habitantes (Nyboe Andersen, 2009), lo que supone del 0.13 al 0.16% del gasto sanitario. (Chambers, 2009). En España, se realizaron 24520 ciclos en el 2000 y 83454 ciclos en el 2007, lo que supone un incremento de la demanda del 250%, con 1810 ciclos /millón de habitantes, indicando el progreso del problema de esterilidad en nuestro país y la importancia de las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA). (Registro SEF, 2007)

#### **4.1. Indicaciones**

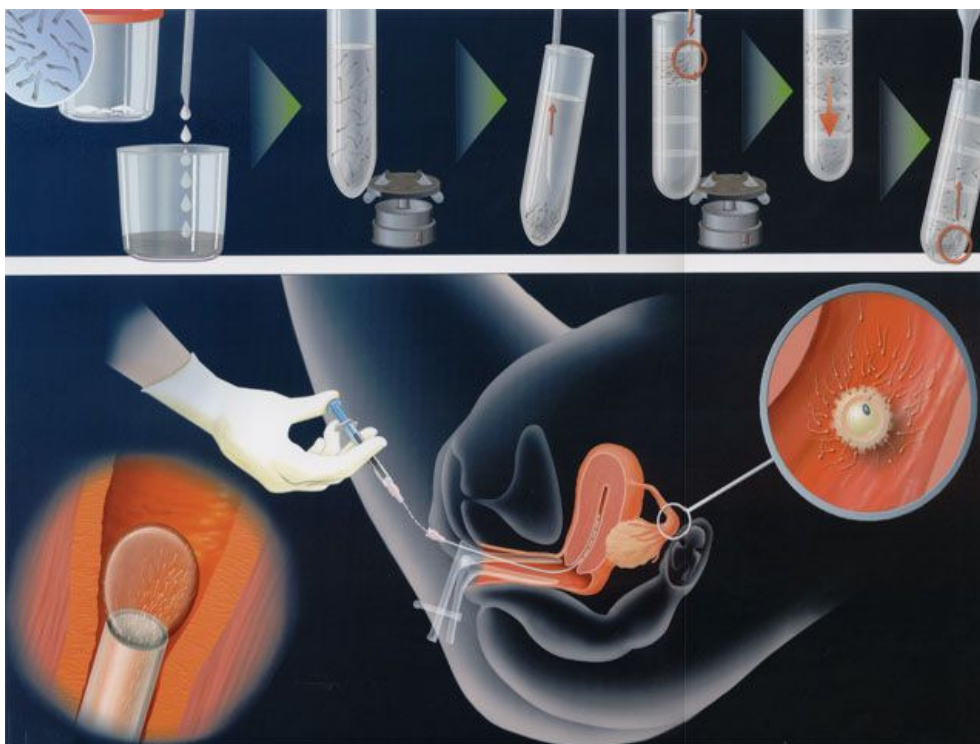
Las indicaciones de las TRA se establecen según la gravedad de las patologías implicadas. Una de ellas es el factor masculino que por sí solo supone el 40 % de las causas de esterilidad y, en combinación con factores femeninos, otro 40%.

Actualmente, no existe tratamiento médico o quirúrgico para tratar la gran mayoría de las alteraciones seminales, siendo las Técnicas de Reproducción Asistida la única opción terapéutica para estas parejas.

El grado de alteración de los parámetros seminales, determina la aplicación de la técnica: Inseminación Intrauterina, (leves-moderadas), Fertilización in Vitro (graves) y Microinyección Espermática (gravísimas). El 30% de los tratamientos de Reproducción Asistida efectuados en España en el año 2008, corresponden a Inseminaciones Intrauterinas Conyugales (Registro SEF, 2007).

#### **4.2. Definición de Inseminación Intrauterina**

La Inseminación intrauterina conyugal (IAC) se define como el depósito de forma no natural de espermatozoides en el interior del útero, cuya intención fundamental es incrementar, en un ciclo concreto, la eficacia en conseguir gestación, al hacer coincidir en la trompa una alta concentración de espermatozoides móviles, con el momento de la ovulación. Se indica en esterilidades de causa desconocida, factores cervicales, disovulaciones, endometriosis leves y factores masculinos leves moderados.



**FIGURA 14.-** Inseminación Intrauterina

### 4.3. Metodología

La realización de este tratamiento necesita un aporte ovocitario y la obtención de un número suficiente de espermatozoides normales y móviles capaces de fertilizar el/los óvulos.

Actualmente, se considera necesario un desarrollo folicular múltiple para optimizar los resultados de la IAC (Zeyneloglu, 1998; Duran, 2002) por lo que se realiza una estimulación ovárica controlada mediante la administración de Citrato de Clomifeno, HMG o FSH, facilitando un desarrollo folicular múltiple. Sus efectos ováricos se monitorizan ecográfica y analíticamente (estradiol plasmático), manteniéndose la medicación hasta obtener folículos de 16-18 mm de diámetro, momento en el que se administra HCG para completar la meiosis ovárica y desencadenar la ovulación.

La muestra seminal se procesa en el laboratorio. Su objetivo es eliminar el plasma seminal, que posee acciones decapacitantes, así como leucocitos, bacterias y los espermatozoides muertos que al producir radicales de oxígeno (ROS), influyen negativamente en la

capacidad de fertilizar el óvulo. Las dos técnicas más empleadas son: el "*swin-up*" que permite recuperar los mejores espermatozoides mediante migración al sobrenadante (Harris, 1981) y el *método de gradientes*, (SupraSperm, Origio Medicult Media, Jyllilge, Dinamarca), donde se obliga a los espermatozoides a atravesar varios gradientes de distinta densidad, obteniendo los espermatozoides del pellet de más densidad (Gorus, 1981). Ambas técnicas obtienen resultados clínicos similares al utilizarse en TRA (Boomsma, 2007) aunque la concentración de espermatozoides móviles progresivos es mayor con la técnica de gradientes, ya que ambos métodos permiten la obtención de una población de espermatozoides con un bajo porcentaje de apoptosis (Ricci, 2009). (Figura 14)

#### **4.4. Resultados**

La Sociedad Española de Fertilidad refiere una tasa de embarazo del 13 al 15% / ciclo de tratamiento, pero en la literatura las cifras varían de 4.6% al 34.4% (van der Westerlaken, 1998; Ragni y cols., 2001). La tasa de éxito de la IIU con la inducción de la ovulación varía ampliamente, con tasas de embarazo entre un 8 y un 20% por ciclo (Dodson, 1991; Guzick, 1999; Goverde, 2000; Allegra, 2007). Estas discrepancias en las tasas de embarazo que hay entre los diversos estudios publicados son debidas al gran número de factores que influyen en los resultados del tratamiento.

#### **4.5. Factores pronósticos**

##### **a. Edad de la mujer**

De gran valor pronóstico, refiriéndose tasas de embarazo del 38.5%/ciclo, en < de 30 años (Merviel, 2010) y del 4.1%/ciclo en > de 40 años (Nuojuua-Huttunen, 1999)

##### **b. Estudio hormonal basal: FSH/E2**

Es un factor pronóstico relativo. Valores de FSH superiores a 10 UI/L y/o valores de estradiol > de 80 pg/ml se asocian a una menor tasa de embarazo (Merviel, 2010).

##### **c. Duración de la Esterilidad:**

Factor controvertido, aunque se establece peor pronóstico si la esterilidad es de más de 6 años de duración (Nuojuua-Huttunen, 1999).

**d. Causa de esterilidad:**

La disovulación (Vlahos, 2005), la esterilidad de causa desconocida (Ahinko-Hakamaa, 2007) y el factor cervical (Steures, 2007) son de buen pronóstico, mientras que la endometriosis III y IV lo empeora (Prado-Perez, 2002).

**e. Protocolo de estimulación:*****Fármacos***

Aunque existen controversias entre el uso de gonadotropinas urinarias o recombinantes en la estimulación ovárica, en general no se considera factor pronóstico en las Inseminaciones Intrauterinas.

***Estradiol el día HCG***

Valores de estradiol > 500 pg/ml el día de la administración de HCG, duplica la tasa de embarazos (Merviel, 2010).

***Numero de folículos***

Influye en el número de folículos reclutados, y la mayoría de los estudios informan de una asociación positiva entre el número de folículos y la tasa de embarazo (Tomlinson, 1996; Nuojua-Huttunen, 1999; Stone, 1999; Dickey, 2002; Ibérico, 2004). Pero la tasa de gestaciones múltiples se incrementa de un 3.7% a 17% / ciclo frente al desarrollo monofolicular (van Rumste, 2008), aunque este incremento disminuye con la edad de la mujer (Karuppaswamy, 2009).

***Número de espermatozoides inseminados***

Un recuento total de espermatozoides móviles de menos de 5 millones parece tener un impacto negativo sobre la tasa de embarazo (Merviel, 2008). Cada adicionales millones de espermatozoides móviles en la muestra de la inseminación lavado parecen aumentar la probabilidad de embarazo en un 2% (Abdallah, 2009).

***Intervalo de tiempo eyaculación - inseminación***

Retrasar el tratamiento del semen de 30 minutos hasta 1 hora y / o retrasar la IIU de 90 minutos hasta 2 horas después de la recolección parece comprometer el resultado del embarazo en los ciclos de IIU (Yavas, 2004).

## 5. ENZIMAS POTEOLÍTICOS

Los enzimas proteolíticos son aquellos que catalizan la ruptura hidrolítica de los enlaces peptídicos. Se clasifican en dos grandes grupos atendiendo al sustrato sobre el que actúan:

- **Proteinasas.**

Hidrolizan proteínas, estructuras formadas por un gran número de aminoácidos, (normalmente superior a 100 unidades). Se dividen en exoproteinasas y endoproteinasas dependiendo de si su acción hidrolítica la llevan a cabo en los terminales aminoácidos de la proteína o en el interior de la cadena proteica, respectivamente. La gran mayoría de las proteinasas son endoproteinasas.

- **Peptidasas:**

Actúan sobre péptidos, estructuras formadas por un menor número de aminoácidos (normalmente inferior a 100 unidades). También se dividen en exopeptidasas y endopeptidasas, atendiendo al mismo criterio de actuación hidrolítica

Dentro del grupo de las exopeptidasas, encontramos las carboxipeptidasas y las aminopeptidasas. Las primeras actuarían sobre la terminación carboxilo, mientras que las segundas lo harían sobre la terminación amino del péptido. Por tanto, además del enlace peptídico, las del primer grupo requieren una carga negativa, mientras que las del segundo grupo la requieren positiva. También se conocen dipeptidasas, adaptadas a la carga en ambos grupos y que, por consiguiente, solo disocian dipéptidos.

La especificidad de los distintos enzimas proteolíticos ha sido determinada utilizando sustratos sintéticos, péptidos y péptidos sustituidos, ya que tan solo empleando estas sustancias se puede tener seguridad en la composición del producto, a pesar de que existen varias excepciones de las normas anteriormente establecidas. Los primeros sustratos introducidos para la caracterización de las aminopeptidasas fueron los descritos por Bergman en 1942.

### 5.1 Enzimas degradadoras de Péptidos Bioactivos: Peptidasas

El interés por el estudio de las peptidasas surgió a finales de la década de los años 70 del siglo pasado con el descubrimiento de que la inhibición del enzima convertidor de angiotensina (ACE) también llamada peptidil-dipeptidasa A (EC 3.4.15.1), tenía efectos

antihipertensivos (Ondetti y cols., 1977). Tres años después se observó la existencia de una  $Zn^{2+}$  metalopeptidasa cuya inhibición producía analgesia, la endopeptidasa 24.11 (Roques, 1980).

A medida que los estudios sobre las enzimas degradadoras de péptidos progresaron, pronto quedó claro que, al igual que sus sustratos, estas biomoléculas se encontraban ampliamente distribuidas y el concepto de "una peptidasa, un sustrato" tuvo que ser rechazado (Schwartz, 1983; Kenny, 1986). Hoy en día, se acepta que, tanto en el tejido nervioso (posiblemente el más estudiado) como en el resto de los tejidos, los péptidos son degradados por un limitado número de enzimas con una especificidad de sustrato relativamente amplia.

A pesar de sus amplios rangos de sustrato, parece existir una cierta especificidad de las peptidasas *in vivo*, la cual estaría determinada por los efectos conjuntos de la propia distribución de una enzima dada y de sus sustratos potenciales (Roques y cols., 1993).

La mayoría de estas peptidasas son ectoenzimas (proteínas integrales de membrana cuyos centros activos se localizan en el espacio extracelular), y por lo general son metaloproteínas con  $Zn^{2+}$  como grupo prostético (Turner, 1986; Maroux, 1987). No obstante, se han descrito alguna de estas enzimas, particularmente dentro del grupo de las Aminopeptidasas, que parecen ser citosólicas (Wagner y cols., 1981; Hersh, 1982) e, incluso, pudieran hallarse asociadas a proteínas integrales de membrana con el sitio activo situado hacia el interior celular (Dyer y cols., 1990).

Dada la importante participación de estos biocatalizadores en las acciones fisiológicas de los péptidos bioactivos, cada vez están adquiriendo mayor relevancia los estudios orientados hacia el descubrimiento y uso de las potenciales propiedades farmacológicas de los inhibidores de las zinc-metalopeptidasas, especialmente de aquellos capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (Rich, 1990; Fournié-Zaluski y cols., 1992).

En los últimos años, se han venido desarrollando diversos estudios sobre el comportamiento de las peptidasas en el sistema reproductor masculino, muchos de ellos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación. (Irazusta y cols., 2004; Valdivia y cols., 2004; Subiran y cols., 2007). Pero dado que se trata de un aspecto relacionado con el presente trabajo de investigación, haremos mención aparte. Concretamente, en el presente proyecto analizamos, en muestras seminales de varones astenozoospermicos, estériles, sometidos a tratamiento reproductor seis peptidasas diferentes:

Endopeptidasa Neutra (NEP), Aminopeptidasa N (APN), Prolil Endopeptidasa (PEP), Piroglutamil Peptidasa (PGA I, PGLU), DipeptilPeptidasa IV (DPP IV), Aminopeptidasa B (APB) y Aminopeptidasa A (APA).

## 5.2. Clasificación y Nomenclatura de las Peptidasas

El 2% de los genes que se transcriben son peptidasas, lo que las convierte en uno de los mayores grupos de proteínas funcionales. Constituyen un grupo muy heterogéneo de proteínas, que pueden encontrarse tanto unidas a membrana como estar presentes en fracciones solubles (ecto y endoenzimas) y presentar tamaños entre 25 y 300 kDa (Taylor, 1993). Por todo ello, no es de extrañar que su clasificación y nomenclatura sea una tarea compleja, que haya ido variando según se ha ido profundizando en su conocimiento.

En los años 90, se establecieron las bases de un sistema de clasificación según sus secuencias y estructuras, empleando la riqueza de nuevos datos disponibles. De esta clasificación surgió la base de datos *MEROPS*, que desde 1996 constituye en Internet una fuente referencial con datos de todas las peptidasas. Esta base de datos, contiene en la actualidad información relativa a más de 1000 peptidasas.

En cuanto a la terminología, hay que tener en cuenta que ésta ha sido confusa, ya que en ocasiones se han empleados nombre diferentes para referirse a la misma enzima.

Históricamente, los términos proteasa, proteinasa y peptidasa han tenido significados ligeramente diferentes. En la actualidad, a pesar de que algunos autores recomiendan el empleo del término "enzima proteolítico" como el más adecuado y fácilmente entendible, desde el NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) se recomienda el empleo del término "peptidasa" para referirse a todas aquellas enzimas que rompen enlaces peptídicos. Así, los miembros de este grupo de proteínas se clasifican en exopeptidasas y endopeptidasas, en función de la situación del enlace que hidrolizan.

Así, **las exopeptidasas** rompen el enlace peptídico del último, o de los últimos 2 ó 3 aminoácidos de la cadena. Si su actuación tiene lugar en el extremo amino terminal se denominan *aminopeptidasas*, *dipeptidil-peptidasas* o *tripeptidil-peptidasas*, respectivamente. Si la hidrólisis sucede en el extremo carboxilo terminal, la enzima sería una *carboxipeptidasa*, o *peptidil-dipeptidasa*. El término *dipeptidasa* hace referencia a exopeptidasas específicas para hidrolizar el enlace



peptídico de los dipéptidos. Por último, las *omega-peptidasas* son enzimas que eliminan residuos terminales que son sustituidos, ciclados o unidos por enlaces isopeptídicos (uniones peptídicas formadas por grupos diferentes al  $\alpha$ -amino y  $\alpha$ -carboxilo).

**Las endopeptidasas** catalizan la ruptura de enlaces peptídicos dentro de la cadena, y se clasifican en base a su mecanismo catalítico. Es decir, según la naturaleza química de los grupos responsables de la catálisis. Así, dentro de este grupo se describen las *aspartil-endopeptidasas*, las *cisteinil-endopeptidasas*, *metaloendopeptidasas*, *seril-endopeptidasas*, *treonil-endopeptidasas*, y en un último grupo se englobarían aquellas que aún no ha sido clasificadas (*unclassified-endopeptidasas*).

En cuanto a las características catalíticas, tanto las *aspartil-endopeptidasas* como las *metaloendopeptidasas* emplean una molécula de agua activada como nucleófilo. El resto de los grupos de endopeptidasas emplean átomos de oxígeno o azufre de la propia cadena lateral.

Dentro del grupo de endopeptidasas, el término oligopeptidasa se refiere a aquellas que actúan sobre cadenas polipeptídicas de menos de 100 aminoácidos (ó 10 kDa).

Una posible **clasificación** de estas enzimas proteolíticas es la propuesta por Marks y cols., (1974, 1968a, 1968b), basada en la afinidad por diferentes sustratos cromogénicos. Según esta clasificación, las aminopeptidasas se agruparían en ácidas, básicas y neutras, dependiendo de que actuaran sobre sustratos ácidos, básicos o neutros, respectivamente. Por otro lado, también se ha nombrado a las peptidasas dependiendo del péptido sobre el que actúan. Así, podrían describirse peptidasas degradadoras de encefalinas, de TRH, o de angiotensina, entre otras.

Un tipo de clasificación jerárquica empleada actualmente, sería la establecida en la base de datos *MEROPS*, construida sobre los conceptos de *Tipo Catalítico*, *Clan*, *Familia* y *Peptidasa* (Rawlings y cols., 2004)

En un primer paso, las peptidasas se agruparían según el *Tipo Catalítico*, es decir la naturaleza química de los grupos responsables de la catálisis anteriormente mencionados, de los cuales tomarían la letra mayúscula inicial (A, C, M, S, T, U) de la clasificación. A continuación las peptidasas se agrupan en clanes o familias, atendiendo a grupos de peptidasas homólogas.

Cada *Clan* agruparía una o varias *Familias*, con un origen común. El nombre del *Clan* vendría determinado por una segunda letra mayúscula, que no se reutiliza en caso de desaparecer el *Clan* en

posteriores reorganizaciones de la clasificación. No todas las *Familias* pueden clasificarse en *Clanes*.

Las *Familias* se agrupan por homología con el miembro del grupo "Más representativo", en base a la unidad peptidásica. La *Familia* aporta un número secuencial a la nomenclatura. Este número tampoco se reutiliza. Por último, cada peptidasa tiene un identificador único, con 2 partes separadas por un punto (·).

Aunque existen diversas clasificaciones, los aportados por la *Enzyme Commission* (EC), son los aceptados actualmente. En esta clasificación las peptidasas se encontrarían dentro del grupo E.C. 3.4, que hace referencia a las hidrolasas que actúan sobre enlaces peptídicos. La subclasificación posterior estaría de acuerdo con la nomenclatura anteriormente mencionada, propuesta por Rawlings y Barrett en 1995 y 1999. Así, en la Tabla 1 aparecen mencionadas las tres enzimas previamente descritas como marcadores tumorales, así como otras peptidasas cuyo estudio pudiera ser de interés en el ámbito arriba descrito.

## **6. AMINOPEPTIDASAS ESTUDIADAS. CARACTERÍSTICAS GENERALES**

### **6.1. Endopeptidasa Neutra (NEP) ( E.C.3.4.24.11)**

#### **Características moleculares**

La NEP (figura 15), conocida también como neprilisina, es también una ectoenzima perteneciente a la familia de proteínas integrales de membrana tipo II. Es considerada una metalopeptidasa

**Tabla 1.-** Clasificación jerárquica de algunas peptidasas. **M:** metaloendopeptidasa, **C:** cisteinil-aminopeptidasa, **S:** seril-aminopeptidasa. **CALLA:** *common acute lymphoblastic leucemia-associated*. Tomado de *IUBMB Biochemical Nomenclature home page* (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>). Los dos primeros nombres asignados a cada enzima corresponden al acrónimo empleado en este trabajo y al nombre aceptado por IUBMB, respectivamente. Los siguientes nombres que aparecen en cada lista corresponden a diferentes denominaciones con las que se pueden encontrar citados dichos enzimas en la bibliografía.

| Tipo catalítico                                      | Clan   | Familia | Nº EC    | Enzima                               |
|--|--------|---------|----------|--------------------------------------|
| M  | MA     | M1      | 3.4.11.2 | APN (*)                              |
|  |        |         |          | Alanil-aminopeptidasa de membrana    |
|  |        |         |          | Aminopeptidasa microsomal            |
|  |        |         |          | Aminopeptidasa M                     |
|  |        |         |          | Aminopeptidasa N                     |
|  |        |         |          | Aminopeptidasa unida a partículas    |
|  |        |         |          | Amino-oligopeptidasa                 |
|  |        |         |          | Alanina aminopeptidasa               |
|  |        |         |          | Aminopeptidasa de membrana I         |
|  |        |         |          | Pseudoleucina aminopeptidasa         |
|  |        |         |          | Aminopeptidasa específica de alanina |
|  |        |         |          | Cinteinilglicina-dipeptidasa         |
|  |        |         |          | Cisteinilglicinasa                   |
|  |        |         |          | L-Alanil-aminopeptidasa              |
| CD13   |        |         |          |                                      |
| 3.4.11.3   | Cys-AP |         |          |                                      |
| Cistil-aminopeptidasa                                |        |         |          |                                      |
| Oxitocinasa  |        |         |          |                                      |
| Cistina aminopeptidasa                               |        |         |          |                                      |
| L-Cistina aminopeptidasa                             |        |         |          |                                      |
| Peptidasa de oxitocina                               |        |         |          |                                      |
| Vasopresinasasa                                      |        |         |          |                                      |
| 3.4.11.6   | APB    |         |          |                                      |
| Aminopeptidasa B                                     |        |         |          |                                      |
| Arilamidasa II                                       |        |         |          |                                      |
| Arginina aminopeptidasa                              |        |         |          |                                      |
| Arginil-aminopeptidasa                               |        |         |          |                                      |
| Arginina aminopeptidasa activada por Cl <sup>-</sup> |        |         |          |                                      |
| Aminopeptidasa citosólica IV                         |        |         |          |                                      |
| L-Arginina aminopeptidasa                            |        |         |          |                                      |
| 3.4.11.14  | PSA    |         |          |                                      |
| Alanil-aminopeptidasa citosólica                     |        |         |          |                                      |
| Arilamidasa  |        |         |          |                                      |
| Aminopolipeptidasa                                   |        |         |          |                                      |
| Aminopeptidasa activada por tiol                     |        |         |          |                                      |
| Aminopeptidasa de hígado humana                      |        |         |          |                                      |

|   |     |     |           |   |
|---|-----|-----|-----------|---|
|   |     |     |           | Aminopeptidasa sensible a la puromicina<br>Alanil-aminopeptidasa soluble<br>Aminopeptidasa citosólica III<br>Alanina aminopeptidasa   |
|   | M13 |     | 3.4.24.11 | NEP (*)<br>Neprilisina<br>Endopeptidasa neutra<br>Endopeptidasa 24.11<br>Peptidasa neutra del borde en cepillo de riñón<br>Encefalinasa (erróneo)<br>Endopeptidasa 2<br>Antígeno CALLA<br>Endopeptidasa<br>Metaloendopeptidasa de membrana<br>Proteinasa neutra del borde en cepillo de riñón<br>Endopeptidasa -2<br>Glicoproteína CALLA<br>CALLA<br>Glicoproteína CALLA<br>Metaloendopeptidasa neutra<br>Metaloendopeptidasa de membrana<br>Endopeptidasa neutra 24.11<br>CD10 |
|   | MH  | M18 | 3.4.11.21 | Asp-AP<br>Aspartil aminopeptidasa   |
| C | CF  | C15 | 3.4.19.3  | PG I<br>Piroglutamil-peptidasa I<br>5-oxoprolil-peptidasa<br>Pirasa<br>Piroglutamato aminopeptidasa<br>Piroglutamil aminopeptidasa<br>L-piroglutamil péptido hidrolasa<br>Pirrolidona-carboxil-peptidasa<br>Pirrolidona-carboxil peptidasa<br>Pirrolidonil peptidasa<br>L-pirrolidonacarboxil peptidasa<br>Piroglutamidasa<br>Pirrolidonecarboxilil peptidasa   |
| S | SC  | S9  | 3.4.14.5  | DPP IV (*)<br>Dipeptidil-peptidasa IV<br>Dipeptidil aminopeptidasa IV<br>Xaa-Pro-dipeptidil-aminopeptidasa<br>Gly-Pro naftilamidasa<br>Postprolina dipeptidil aminopeptidasa IV<br>Antígeno de linfocito CD26   |

---

|           |   |
|-----------|---|
|           | Glicoproteína GP110                         |
|           | Dipeptidil dipeptidasa IV                   |
|           | Glicilprolina aminopeptidasa                |
|           | X-prolil dipeptidil aminopeptidasa          |
|           | Pep X                                       |
|           | Antígeno de leucocito CD26                  |
|           | Glicilprolil dipeptidilaminopeptidasa       |
|           | Dipeptidil-péptido hidrolasa                |
|           | Glicilprolil aminopeptidasa                 |
|           | Depeptidil-aminopeptidasa IV                |
|           | DPPIV/CD26                                  |
|           | Amino acil-prolil dipeptidil aminopeptidasa |
|           | Molécula Tp103                              |
|           | activadora(tiggering) de células T          |
|           | X-PDAP                                      |
| 3.4.21.26 | PEP   |
|           | Prolil oligopeptidasa                       |
|           | Enzima de actuación post-prolina            |
|           | Endopeptidasa específica de prolina         |
|           | Endopeptidasa post-prolina                  |
|           | Endoprolilpeptidasa                         |
|           | Prolil endopeptidasa                        |

---

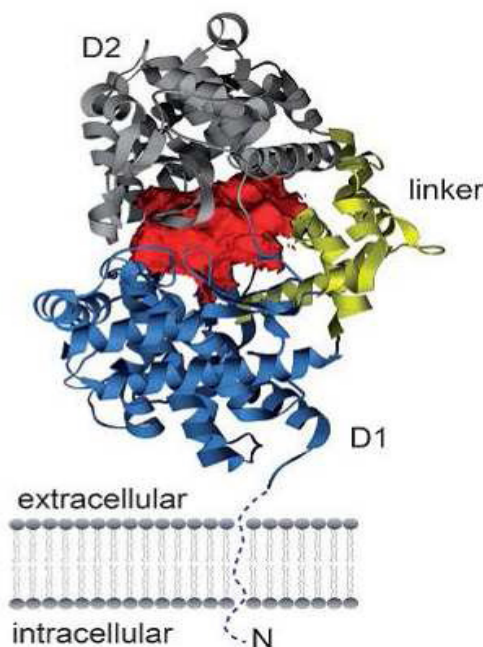
dependiente de  $Zn^{2+}$ , HExxH, en su centro activo, característico de la familia de proteínas M13 (Chen, 1998). Otros miembros de la familia incluyen enzimas convertidoras de endotelinas (ECE-I y ECE 2). En la actualidad, se conoce también una enzima, la neprilisina II (NEPII), con una alta homología a la NEP, implicada principalmente en regular la función reproductora (Carpentier y cols., 2004).

Como enzima representativa de la Familia M13, es una endopeptidasa cuya acción está restringida a péptidos de entre 40 y 50 aminoácidos de longitud. Además, presenta alta especificidad por el extremo N-terminal de los aminoácidos hidrofóbicos, principalmente leucina, metionina y fenilalanina (Kerr y Kenny, 1974). Así, sus principales sustratos *in vivo* parecen ser las encefalinas, taquicininas, así como, sustancia P, endotelinas, bombesina y bradiquininas (McLellan y cols., 1988; Roques y Beaumont, 1990).

La NEP humana está codificada por el gen MME localizado en el cromosoma 3 (q25.1-25.2). Su purificación y clonación revelaron que esta proteína integral de membrana, posee un corto dominio citoplasmático, una región hidrofóbica transmembrana y un largo dominio extracelular que contiene el sitio activo (Malfroy y col., 1988). Normalmente aparece como un homodímero de membrana unido no

covalentemente (Shimada y cols., 1996). Cada cadena polipeptídica, con un peso molecular de unos 100kDa aproximadamente, se encuentra altamente glicosilada y posee cuatro residuos conservados de cisteína que parecen estar implicados en el mantenimiento de la estructura y la actividad enzimática (Tam y cols., 1985). Además, la NEP es idéntica al cluster de diferenciación CD10 y al marcador de linfocitos llamado CALLA (Letarte y cols., 1988; Roques y cols., 1993).

La NEP se encuentra ampliamente distribuida en el organismo humano. En el SNC está discretamente distribuida en el cerebro de rata y su distribución coincide con la de los receptores opioides (Waksman y cols., 1986), localizándose en caudado putamen, sustancia negra, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio y en la sustancia gelatinosa de la médula espinal (Roques y cols., 1993). En cuanto a su distribución celular, aunque la NEP se localiza principalmente en los botones axonales de neuronas, también se ha detectado en dendritas neuronales, oligodendrocitos, astrocitos y células de Schwann (Marcel y cols., 1990; Matsas y cols., 1989; Kioussi y cols., 1992).



**FIGURA 15.-** Estructura tridimensional de la endopeptidasa neutra.

En los tejidos periféricos, la NEP se expresa constitutivamente en el riñón y se localiza principalmente en el borde en cepillo de las membranas renales y es particularmente abundante en los nódulos linfáticos y en la placenta. Además, está presente en diferentes órganos como pulmón, testículos y próstata, y en diferentes tipos celulares como fibroblastos, neutrófilos, células epiteliales y endocrinas (Sales y cols., 1991). Se encuentra también en células del sistema hematopoyético como macrófagos, leucocitos o neutrófilos y es considerada marcador de linfocitos. Finalmente, se han detectado altas concentraciones de NEP en distintos órganos reproductores tales como testículos o próstata

### **Sustratos e inhibidores**

Al igual que la APN, la NEP es capaz de degradar un amplio abanico de sustratos. Además de las encefalinas, son sustratos naturales de la NEP otros péptidos bioactivos como la sustancia P, el péptido atrial natriurético, la oxitocina, las bradiquininas, la endotelina-1 y la familia de las bombesinas.

Debido a que esta ubicua enzima interviene también en diferentes procesos fisiológicos, se han desarrollado numerosos inhibidores selectivos de la enzima e inhibidores menos selectivos que inhiban otras peptidasas que participan en el mismo proceso fisiológico. Entre los más desarrollados están los inhibidores para la analgesia en combinación con la inhibición de la APN para la insuficiencia cardiaca y/o tratamiento de hipertensión en combinación con la ACE (Trindade y cols., 2001) y para enfermedades respiratorias (Nadel, 1990). Actualmente, ha sido propuesta como diana terapéutica para la enfermedad de Alzheimer (Nalivaeva y cols., 2008). Los inhibidores más utilizados en investigación son el tiorfan y el fosforamidón.

### **Mecanismos de acción**

#### *Degradación enzimática de péptidos*

La NEP es una oligopeptidasa que hidroliza enlaces de residuos aminoácidos hidrofóbicos de diferentes péptidos bioactivos (Tabla 4)

### *Transducción de señales*

Al igual que otras peptidasas de membrana, a parte de su capacidad catalítica, la NEP puede actuar como molécula señalizadora e inducir vías de señalización intracelular que regulan, entre otros, el crecimiento celular (Ganju y cols., 1996; Angelisová y cols., 1999) y/o la apoptosis (Cutrona y cols., 1999). La NEP transduce señales intracelulares independientemente de su actividad catalítica. En modelos celulares de cánceres de próstata la NEP, catalíticamente inactiva, induce una fosforilación parcial de la quinasa de adhesión focal (FAK) a través de la vía de la quinasa fosfoinositol-3 (PI3-K) favoreciendo la migración celular (Ganju y cols., 1996). El corto dominio intracitoplasmático de la NEP carece de residuos de activación conocidos por lo que es incapaz de unirse directamente con la proteína PI3-K. La NEP se asocia indirectamente con p85, subunidad reguladora de PI3-K a través de la quinasa Lyn, impidiendo la interacción de PI3-K con FAK (Angelisová y cols., 1999)

Además, la NEP es capaz de asociarse con otras proteínas. Por un lado, con las proteínas ezrina, radixina y moesina (ERM) cuya interacción inhibe la migración celular mediada por CD44 al impedir la asociación de las proteínas ERM y CD44 (Iwase y cols., 2004). Por otro lado, con el supresor de tumor PTEN inhibiendo las vías de crecimiento y supervivencia celular reguladas por las quinasas Akt/PKB (Sumitomo y cols., 2004).

### **Funciones**

Debido a su capacidad de degradar múltiples sustratos y a su ubicua localización, esta multienzima interviene en diferentes procesos. Como enzima, modula la actividad de péptidos bioactivos que participan en numerosos procesos como: 1) la analgesia, 2) la presión arterial degradando péptidos vasoactivos, 3) la contracción del músculo liso en el tracto respiratorio y en el útero. Además, la NEP actúa mediante enzimas y/o moléculas señalizadoras en procesos como 4) la neuroprotección y neurodegeneración, 5) la reacción inflamatoria y 6) la progresión tumoral que es suprimida en varios cánceres, entre ellos, el cáncer de próstata (Sumitomo y cols., 2005), de pulmón (Shipp y cols., 1991) y/o de riñón (Varona y cols., 2007). Finalmente, al estar presente en linfocitos, se usa como marcador de leucemias con el nombre de CALLA (Turner y cols., 2001).



## **6.2 Aminopeptidasa N (APN, EC 3.4.11.2)**

### **Características moleculares**

La APN (figura 16) es una ectoenzima localizada en la membrana plasmática de las células como una proteína integral de membrana tipo II. Debido a un dominio HELAH dependiente de  $Zn^{2+}$  en su centro activo, se la considera una metalopeptidasa y es idéntica al antígeno de diferenciación CD 13 (Look y cols., 1989; Shipp y cols., 1993).

La APN está codificada por el gen ANPEP (Look y cols., 1989) localizado en el cromosoma 15 (q25-26) (Watt y cols., 1990) y se expresa bajo la activación de dos promotores (Shapiro y cols., 1991). Estructuralmente consta de dos subunidades, no unidas covalentemente, con un peso molecular aproximado de unos 150 kDa (Sjöström y cols., 2000). Cada cadena polipeptídica se encuentra altamente glicosilada pudiendo ser el equivalente de hasta el 20% del total de su masa (Lendeckel y cols., 1999). Las cadenas constan de un dominio extracelular donde se encuentra el centro catalítico, un dominio transmembrana y un corto dominio citoplasmático donde se encuentra el extremo N-terminal (Olsen y cols., 1988). Normalmente la APN se encuentra en la membrana plasmática como homodímero y su dimerización se produce en el retículo endoplasmático antes de ser glicosilada en el aparato de Golgi (Danielsen y cols., 1994).

A pesar de expresarse principalmente como enzima de membrana, existe una forma soluble de APN en fluidos corporales (plasma sanguíneo, orina y líquido seminal) (Antczak y cols., 2001; Jung y cols., 1984; Fernández y cols., 2002), aunque su mecanismo de liberación desde la membrana es todavía desconocido.

La APN se encuentra ampliamente distribuida en el organismo. En el sistema nervioso está distribuida en el cerebro, en el cordón espinal y en diferentes células del tejido nervioso (Jardinaud y cols., 2004). Por otra parte, está altamente expresada en el borde en cepillo de las membranas renales (Pfleiderer y Celliers, 1963) y en enterocitos, en células epiteliales, endoteliales y en fibroblastos, así como en células de la mucosa del intestino delgado y en el hígado (Jardinaud y cols., 2004; Riemann y cols., 1999). Se encuentra expresada también en células madre del sistema hematopoyético como granulocitos y monocitos de distintos grados de diferenciación, por lo que se le ha considerado marcador de diferenciación (Razak y cols., 1992).

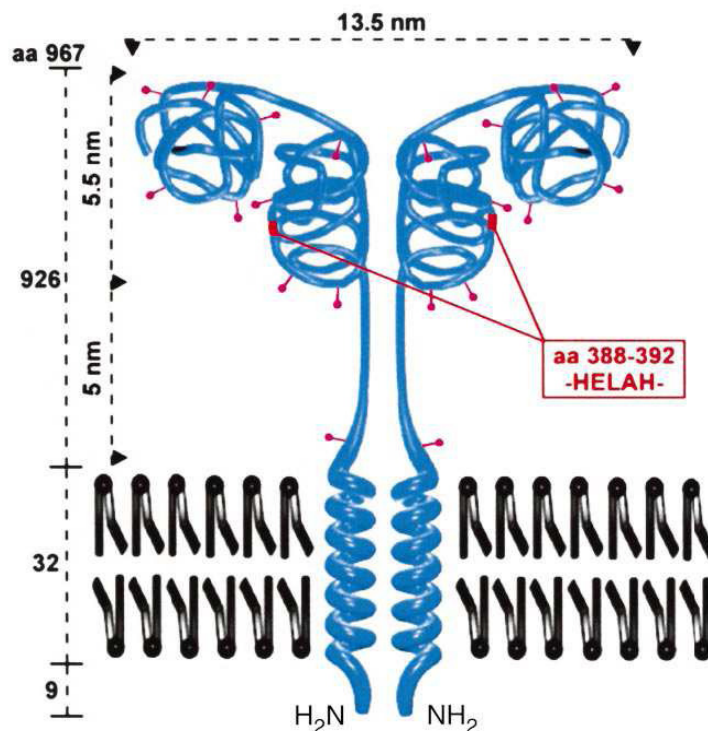


FIGURA 16.- Estructura tridimensional de la Aminopeptidasa neutra.

Además, la expresión de las formas tanto soluble como unida a membrana de la APN se encuentra des-regulada en numerosos tipos de células tumorales como melanomas, células cancerígenas de riñón, de colon, de páncreas, de próstata, de intestino y/o de tiroides. (Antczak y cols., 2001; Varona y cols., 2007; Blanco y cols., 2008)

### Sustratos e inhibidores

La APN regula la actividad de péptidos como las encefalinas, angiotensinas, quininas, citoquinas y quimocinas o proteínas de la matriz extracelular entre otras, interviniendo en importantes procesos biológicos.

Debido a su multifuncionalidad, la APN juega un papel importante en diferentes patologías, por lo que ha sido propuesta como diana terapéutica de numerosos procesos para los que se han desarrollado una gran cantidad de inhibidores naturales y sintéticos (Roques y Noble, 1995; Bauvois y Dauzonne, 2006). Las

bradiquininas, la sustancia P o la opiorfina son péptidos naturales capaces de inhibir la APN en concentraciones micromolares (Xu y cols., 1995; Wisner y cols., 2006).

Farmacológicamente se desarrollan inhibidores selectivos de la APN con características anti-tumorales (que inhiben la angiogénesis), anti-virales, o pro- apoptóticos de células leucémicas (Luan y Xu, 2007) e inhibidores conjuntos en combinación con la NEP que posean características analgésicas (Roques y cols., 1993). Entre los inhibidores más utilizados en investigación se encuentran la amastatina, la bestatina y la leuhistina.

### **Mecanismos moleculares de acción**

#### *Degradación enzimática de péptidos*

La APN fue nombrada así por su capacidad de eliminar fundamentalmente aminoácidos neutros (también puede degradar aminoácidos básicos) del extremo N terminal de péptidos biológicamente activos con el siguiente orden de preferencia: Ala>Phe>Tyr>Leu>Arg>Thr>Trip>Lys>Ser>Asp>His>Val (Hooper, 1994) (Tabla 3).

La acción de su hidrólisis libera el aminoácido del extremo amino terminal de péptidos entre 3 y 16 residuos de aminoácidos. Como hemos mencionado anteriormente, su acción es mayor cuando este aminoácido es alanina, a pesar de que también actúa cuando se encuentran otros aminoácidos, incluida la prolina (si bien en este caso la acción es mucho más lenta). La presencia de un residuo hidrofóbico seguida de prolina, provoca la hidrólisis intacta del dipéptido resultante (McDonald y Barrett, 1986). Además, hidroliza muchos dipéptidos, pero no aquellos que contengan residuos aspartil, glutamil, histidil, glicil, prolil o valil en el extremo N-terminal (O'Cuinn, 1997).

#### *Endocitosis*

Una de las funciones conocidas de la APN es la de actuar de receptor del virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV) (Delmas y cols., 1992) y/o del coronavirus humano 229E (Yeager y cols., 1992), lo que conlleva una internalización de la enzima por el sistema de caveolinas (Nomura y cols., 2004). Por otra parte, la APN podría participar en la recaptación de colesterol por los enterocitos a través de su internalización, debido a que se ha identificado a la APN como

diana de Ezetimibe® un inhibidor de la absorción intestinal de colesterol (Kramer y cols., 2005).

### *Transducción de señales*

Recientemente, se ha observado que enzimas de membrana como la enzima convertidora de angiotensina (ACE) (Kohlstedt y cols., 2004), la dipeptidil IV (DPPIV) (Ohnuma y cols., 2004), la NEP (Sumitomo y cols., 2004) y la APN (Santos y cols., 2000) son capaces de actuar como moléculas señalizadoras. La APN es capaz de transducir señal al interior celular independientemente de su actividad enzimática. En miocitos, el entrecruzamiento de la APN con anticuerpos anti-APN induce la fosforilación de proteínas de la cascada de las MAPKs, el influjo de  $Ca^{2+}$  hacia el interior celular, la secreción de citoquinas y la adhesión celular (Santos y cols., 2000; Mina-Osorio y cols., 2006). Sin embargo, el corto dominio intracitoplasmático de la APN no contiene ningún dominio de señalización conocido (Mina-Osorio, 2008). Por tanto, se cree que la capacidad señalizadora de la APN depende de su asociación con proteínas auxiliares (Sjöström y cols., 2000). En este sentido, la APN co-inmunoprecipita con las moléculas adaptadoras Grb2 y Sos en células de líneas celulares promonocíticas U-937 (Mina Osorio y cols., 2006). Además, anticuerpos anti-APN inducen el co-entrecruzamiento de la APN con receptores Fc $\gamma$  (receptores para inmunoglobulinas IgG) incrementando los niveles de fosforilación de Syk inducidos por el receptor (Mina-Osorio y Ortega 2005) y confirmando la idea de que la señal transducida por la APN se produzca a través de su unión a moléculas con dominios de señalización conocidos (Mina-Osorio, 2008).

### **Funciones**

Dependiendo de su localización, esta enzima multifuncional se encuentra implicada en múltiples y diferentes procesos. Algunas de las funciones en las que interviene son 1) regulación enzimática de péptidos bioactivos 2) actuación como receptor viral, 3) invasión de células tumorales, 4) diferenciación celular, 5) procesos de proliferación y apoptosis, 6) procesos de quimiotaxis, 7) presentación de antígenos, 8) cristalización y re-captación de colesterol, 9) adhesión celular como molécula auxiliar, 10) procesos de fagocitosis y, finalmente, 11) angiogénesis (Mina-Osorio, 2008).

### **6.3. Prolil endopeptidasa (E.C.3.4.21.26) (prolil oligopeptidasa) (PEP) (seryn proteasa soluble)**

La prolil oligopeptidasa pertenece a un grupo de peptidasas serinas denominada "familia prolil oligopeptidasa", que incluye la dipeptidil peptidasa IV, peptidasa acylaminoacyl y oligopeptidasa B, además del prototipo oligopeptidasa prolil, que no pueden hidrolizar péptidos que contengan más de 30 residuos.

La prolil oligopeptidasa (POP; EC 3.4.21.26) es una serina proteasa citosólica que hidroliza la prolina que contienen péptidos pequeños (Polgár, 2002). En los últimos años esta proteasa se ha venido asociando con el metabolismo de inositol-1,4,5-P<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>), una molécula clave en la cascada de transducción de señales neuropéptido. (Williams y cols., 1999; Schulz y cols., 2002; Di Daniel y cols., 2009).

Esencialmente es una enzima citosólica que ha sido descrita además como enzima sérica y de membrana (Gotoh y cols., 1988; O'Leary y cols., 1996; Szeltner y Polgár, 2008). Es una endopeptidasa con la capacidad de hidrolizar péptidos en el residuo prolina interno, en su extremo carboxilo unido al péptido (Gass y Khosla, 2007). (Figura 17)

Se trata de una enzima monomérica con un peso molecular aproximado de 75 kDa, su pH es óptimo alrededor de 7.5. Su actividad se incrementa con NaCl, potasio, fosfato e iones nitrato y se inhibe con Z-thio-prolina-thioprolinal (Gass y Khosla, 2007). La prolil endopeptidasa rompe específicamente la unión prolina, mencionada anteriormente, en péptidos biológicamente activos tales como, sustancia P, oxitocina, vasopresina, neurotensinas, angiotensina II, dinorfinas, bradiquininas, hormona liberadora de tirotrópina, hormona luteinizante y hormona estimuladora de alfa-melanocitos (Welches y cols., 1991; Umezawa y cols., 2004).

POP se encontró por primera vez en el útero humano como la enzima que degrada la oxitocina (Se considera una proteína citoplasmática soluble. Los estudios de distribución de POP han indicado que la enzima se expresa activamente en áreas del cerebro contienen receptores de diversos neuropéptido, como los receptores NK1 y SP NK3, los receptores del AVP V1A y V1b receptores de la TRH y TRH-R1 y TRH -R2 Bellemere y cols., 2004).

Es poco conocido el papel fisiológico de la POP en el cerebro. Sin embargo, en el cerebro de rata se ha localizado en el tálamo cortical y en las neuronas de proyección corticotálamico, en el complejo ventrobasal y núcleo geniculado medial del tálamo y en el cortex somatosensorial/motor y en el cortex auditivo, observando que el 50% de las neuronas de proyección en el cortex y el tálamo contienen POP, por lo que esta enzima podría estar implicada en el procesamiento de señales tálamo-cortical y corticotálamico. (Myöhänen y cols., 2009).

La POP participa en varios aspectos del sistema nervioso central (SNC), incluido el aprendizaje, memoria y estado de ánimo. Se ha sugerido su participación en procesos patológicos, como la alimentación y los trastornos del estado de ánimo, hipertensión y trastornos del ciclo celular, así como en los procesos neurodegenerativos que ocurren en la enfermedad de Alzheimer, Huntington y la enfermedad de Parkinson. Se está realizando el desarrollo acelerado de los inhibidores de la POP al descubrir que estos compuestos revierten la pérdida de memoria en modelos animales y de que la expresión de los POP se correlaciona con la edad. (Männistö y cols., 2007; García-Horsman y cols., 2007).

Hoy en día, varios inhibidores de la POP ya han sido evaluados en ensayos preclínicos, como fármacos potenciales para el tratamiento del déficit de memoria natural que ocurren con el envejecimiento patológico o la pérdida de la memoria característica de la enfermedad de Alzheimer. El inhibidor de la POP, S-17092-1 ha sido probado en ensayos clínicos de fase I por su capacidad para mejorar la cognición. (Morain y cols., 2000; 2007).

La expresión de Prolil oligopeptidasa (POP) en testículo de ratón es máxima a los 2 semanas de vida, reduciéndose gradualmente a partir de entonces. Las señales positivas se detectaron en todos los tipos de células en los túbulos seminíferos antes de la maduración, y se limitaron a espermátidas en el ciclo de la espermatogénesis en estadios I-VIII en ratones adultos.

La POP se detectó en la fracción insoluble de los espermatozoides. Análisis inmunohistoquímicos demostraron que esta localizada en las espermátidas en los pasos 12-16 de espermiogénesis y en la pieza intermedia del flagelo. También se encontró que los inhibidores específicos de POP (poststatin y benzyloxycarbonyl-proline-prolinal), suprimen la motilidad espermática. Kimura sugiere que la POP puede estar involucrada en la meiosis de los espermatoцитos, la

diferenciación de las espermátidas, y motilidad de los espermatozoides en el ratón. (Kimura y cols, 2002).

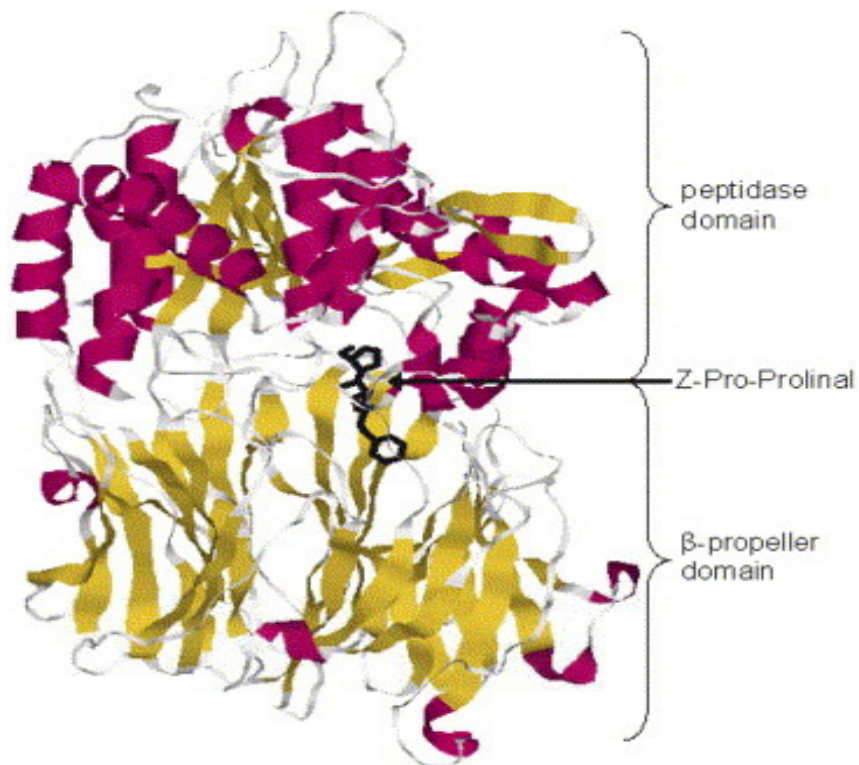


FIGURA 17.- Estructura tridimensional de la Prolil oligopeptidasa

#### 6.4 Dipeptidyl peptidasa IV (DPP-IV, EC 3.4.14.5, T-cell activation antigen CD26)

La DPP-IV (figura 18) pertenece a un grupo de serin-peptidasas denominada "familia prolil oligopeptidasa", que no pueden hidrolizar péptidos que contengan más de 30 residuos

Es una glicoproteína transmembrana tipo II, que presenta un extremo amino terminal de tan sólo 6 aminoácidos hacia el citoplasma, un dominio hidrofóbico que la ancla a la membrana y un gran dominio extracelular en el que se halla el centro activo. También se ha visto, que en ocasiones, la pérdida del extremo amino terminal insertado en la membrana, puede originar su presencia en forma

soluble en suero humano (Iwaki-Egawa y cols., 1998, Wesley y cols, 1999; Carl-McGrath y cols., 2006). (Figura 18)

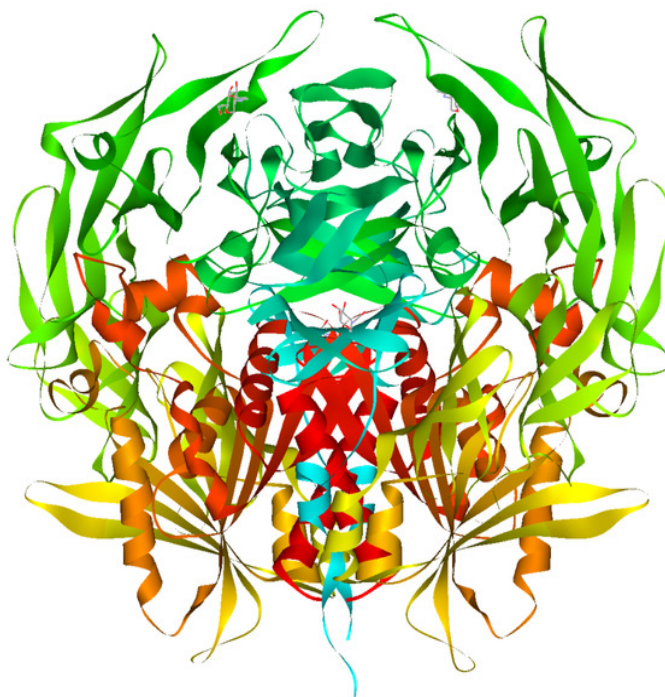
Así, se ha descrito que esta enzima está involucrada en la activación e inactivación de un gran número de citoquinas y quimocinas (Havre y cols., 2008) y además de su acción sobre péptidos bioactivos y su papel en el sistema inmune, esta aminopeptidasa tendría especial relevancia en el transporte específico de algunos dipéptidos y tripéptidos (Tiruppathi y cols., 1990).

El monómero de DPP-IV es una glicoproteína de 110-kDa con 776 aminoácidos. Consta de un gran dominio extracelular (C-terminus), conectado a un dominio transmembrana hidrofóbico y un corto dominio intracelular (N-terminal) (Engel y cols, 2003; Lambeir y cols, 2003). La dimerización de la DPP-IV (pm 240kd) es un prerrequisito para su actividad enzimática. Esta forma molecular carece de componente transmembrana e intracelular. Típicamente esta presente como un homodímero con pm 210-290 kd, pero también forma grandes complejos moleculares de 900 kd (Lambeir, 2003). Existe también un homólogo de la DPP-IV soluble, localizado a nivel intracelular y en el plasma sanguíneo. Tiene una actividad óptima a pH 7.8. Puede ser inhibida por PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo o fenilmetanosulfonilo), diprotina A, bacitracina, puromicina y por los agentes tiol-reactivos: p-cloromercuribenzoato y N-etilmaleimida (Kikkawa y cols., 2005).

La DPP-IV rompe los dipéptido Xaa-Pro o Xaa-Ala del N-terminal de los péptidos. Esta rara especificidad de substrato es crucial para la regulación funcional de los péptidos bioactivos y su resultado de potencial de señalización. Tras el procesamiento de la DPP-IV, los péptidos pueden ser degradados por proteasas menos específicas.

La DPP-IV regula las actividades funcionales de algunos importantes mediadores tales como hormonas, citocinas y quimocinas (Gorrell, 2005) Además, también ejecuta varias funciones por medio de interacciones intermoleculares no hidrolíticas con la adenosina deaminasa (ADA) (Weihofen y cols., 2004), plasminogeno (González-Gronow y cols., 2001), la glicoproteína 120 del HIV (Jacotot, 1996) y la proteína de transactivación del HIV (Tat protein) (Subramanyam y cols., 1993). También interactúa con proteínas de la matriz extracelular (ECM) como el colágeno (Hanski y cols., 1988) y la fibrinonectina (Yu y cols., 2006, mediando la adhesión celular a la matriz extracelular.





**FIGURA 18.-** Estructura tridimensional de la dipeptidil peptidasa IV.

La DPP-IV es expresada como una enzima plenamente activa, regulada por la expresión génica, transcripción y translación. En el hepatocito el factor nuclear 1 $\alpha$  actúa como un factor de transcripción de la DPP-IV en las células epiteliales intestinales y en el hepatocito (Ericsson y cols., 1999). La DPP-IV se expresa en las células epiteliales, fibroblastos y linfocitos, y en varios órganos (músculo cardíaco, músculo esquelético). La DPP-IV es esencial para la mayoría de las actividades enzimáticas de sus tejidos. Curiosamente las neuronas positivas para DPP-IV solo fueron encontradas en el cerebro fetal, desapareciendo su actividad en el desarrollo neuronal posterior. En el cerebro maduro, la DPP-IV es localizada solo en las células epiteliales de los vasos de la barrera hemato encefálica y sobre el epéndimo (Lambeir, 2003). Además la DPP-IV/CD26 se considera un marcador de la actividad celular en la inmunidad (Fleischer, 1994).

La actividad enzimática asociada a la DPP-IV está también presente en el plasma sanguíneo, líquido cerebroespinal y otros fluidos corporales. La mayoría de esta actividad es atribuida a la fracción soluble. El origen de esta isoforma permanece sin aclarar, aunque se especula que puede surgir de la membrana plasmática endotelial o de

las células epiteliales o de los linfocitos circulantes por división proteolítica de la molécula transmembrana original. Se supone que la DPP-IV circulante inactiva péptidos bioactivos circulantes protegiendo al organismo frente a sus efectos sistémicos inapropiados (Lambeir, 2003; Gorrell, 2005).

Se ha encontrado actividad DPP en testículos y epididimos de algunos mamíferos (bovinos y ratas). Esta actividad es causada por DPP 4 en el epidídimo, mientras que en los testículos es atribuida a DPP8/9. No se encontró actividad DPP en los espermatozoides a excepción de los incrustados en el epitelio, justo antes de su liberación a la luz y en las espermátides que presentaban una tinción específica para DPP9. (Dubois y cols., 2009).

### **6.5. Piroglutamil peptidasa I**

La piroglutamil peptidasa I (PAP-I, PGPEPI, EC 3.4.19.3) es una cistein peptidasa citosólica, con una amplia distribución tisular, que elimina hidrolíticamente los residuos terminales L-pyrogutamato (L-pGlu) de las proteínas y péptidos L-pGlu (Barret y cols., 2001; Dando y cols., 2003). Estos residuos de L-pGlu confieren estabilidad en los péptidos que están vinculados a ellos y evitan la degradación prematura por endopeptidasas. También ha sido descrita en la membrana plasmática (Alba y cols., 1995; Cummins y O'Connor, 1998).

Su actividad óptima se da a pH 8.5 y el peso molecular de la enzima es aproximadamente de 22 kDa. Esta exopeptidasa puede ser inhibida por agentes tiol-reactivos, 5-oxoprolinal y piroglutamil diazometil cetona (Mc Donnell y cols., 1997).

Hasta la fecha, tres formas distintas de esta enzima se han identificado en los tejidos de los mamíferos. La PAP tipo I es una típica cistein peptidasa citosólica, de baja masa molecular y con una amplia especificidad de sustrato. La PAP tipo II ha demostrado ser una metaloenzima anclada a membrana, de alto peso molecular, con una especificidad de sustrato estrecha limitada a los factores de liberación hipotalámica, (hormona liberadora de tirotropina, TRH, pGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub>). Una tercera actividad piroglutamil peptidasa también se ha observado en el suero de mamíferos, mostrando características bioquímicas muy similares a las de tipo II, es decir, un peso molecular elevado, alta sensibilidad a agentes quelantes de metales, y una especificidad de sustrato estrecha también restringida a la TRH. Esta

actividad sérica posteriormente ha sido designado tiroliberinas ("thyroliberinase") (Cummins y O'Connor, 1998).

Amplias evidencias indican que la piroglutamil aminopeptidasa II (PAP-II, EC 3.4.9.16) es la principal enzima responsable de la finalización de la acción de la TRH neuronal por eliminación del residuo L-pGlu (Charli y cols., 1998). La PAP II es una zinc-métaloenzima de membrana localizada en el Sistema Nervioso Central, con alta especificidad enzimática para la TRH y compuestos relacionados (Cummins y O'Connor, 1998).

Los sustratos para PAP-I, incluyen péptidos biológicamente activos como TRH, LH-RH y neurotensina y dipéptidos como L-pGlu-L-Ala y L-pGlu-L-Val (Browne and O'Cuinn, 1983; Tsuru y cols., 1982). Sin embargo, en general se considera que las peptidasas citosólicas no tienen actividad metabólica sobre estos neuropeptidos, ya que son hidrolizados por ectoenzimas localizadas en la membrana celular, con actividad en el espacio extracelular o por peptidasas lisosómicas tras la endocitosis (O'Cuinn y cols., 1990). La hidrólisis de la TRH in vivo es controvertida (Charli y cols., 1998) (Faivre-Bauman y cols., 1986), no habiéndose encontrado cambios en la actividad TRH del cerebro de ratón en presencia de inhibidores de PAP-I. Sin embargo el estudio inmunohistoquímico demostró una distribución heterogénea de la enzima en la pituitaria (tejido diana de TRH) pero a nivel citosólico (Abe y cols., 2004).

El gen que expresa la piroglutamil peptidasa (PGPEP1) se localiza en el cromosoma 19p13. Consta de cinco exones, de los cuales los exones 1-4 y parte del exón 5 se traduce en una proteína que contiene 209 aminoácidos con un dominio de peptidasa C15 y una tríada catalítica de tres aminoácidos que está altamente conservada (Monsuur y cols., 2006).

La PAPI está ampliamente distribuida en diversos tejidos y su función biológica real puede depender en gran medida del tipo de tejido en el que reside (Aguirregoitia y cols., 2007). Así, en el intestino delgado, que se expone a la dieta de péptidos xenobioticos, esta función puede implicar la eliminación de los residuos L-pGlu terminales, para facilitar su posterior degradación por endopeptidasas, neutralizando cualquier potencial intrínseco tóxico o inmunogénico (Monsuur y cols., 2006).

Ha sido referida su presencia en fluidos de secreción como el semen humano (O'Cuinn y cols., 1990), habiéndose observado en todas las fracciones del líquido seminal, presentando una mayor

actividad en la fracción de espermatozoides. Esta actividad era mayor en semen con necrozoospermia que en semen con normozoospermia, por lo que se ha sugerido que este enzima podría participar en la regulación de los niveles de los análogos de TRH seminales y en la mediación de la muerte asociada con el espermatozoides necrozoospermico. (Valdivia y cols, 2004).

### **6.6. Aminopeptidasa B (APB, Aminopeptidasa básica, E.C.3.4.11.6.)**

La Aminopeptidasa B pertenece a la familia de las metaloproteasas M1. Es una  $Zn^{2+}$  exopeptidasa dependiente que elimina selectivamente arginina y / o residuos de lisina del extremo N-terminal de varios sustratos, incluyendo arg0-Leu-enkefalina, arg0-Met-enkefalina y Arg -1-Lys0-somatostatina-14. El análisis de su estructura primaria mostró que está relacionada estructuralmente con la leucotrieno A4 hidrolasa, una enzima importante de la vía del ácido araquidónico. Esta relación estructural se ve reforzada por la capacidad de aminopeptidasa-B para hidrolizar leucotrieno A4.

Ha sido descrita principalmente en el citosol, aunque también puede encontrarse en el retículo endoplásmico e incluso secretarse a la matriz extracelular (Lauffart y cols., 1988; Tanioka y cols., 2003; Cadel y cols., 2004). La APB elimina aminoácidos básicos (arginina y lisina), de ahí su nombre, desde el extremo amino-terminal de péptidos que contienen dos, tres y algunas veces cuatro aminoácidos (Hopsu y cols, 1966; Foulon y cols., 1999).

Esta exopeptidasa que posee un peso molecular de aproximadamente 72 kDa y desarrolla su actividad óptima a pH 7. Esta actividad es estimulada por iones clorados ( $Cl^-$ ) e inhibida por agentes quelantes (EDTA, EGTA: ácido tetraacético del glicol de etileno y 1,10-fenantrolina), bestatina, agentes tiol-reactivos y específicamente por arfamenina A y B (Cadel y cols., 1995; O'Cuinn, 1997; Piesse y cols., 2004). Entre sus sustratos naturales podemos encontrar, bradiquininas, enkefalinas, somatostatina, angiotensina III y kalidinas (McLellan y cols., 1988; Piesse y cols., 2004).

Presenta características bifuncionales en las fases finales de los mecanismos de procesamiento de los precursores que se produzcan en la vía secretora, en la membrana plasmática, o en ambos lugares. (Foulon y cols., 1999). Está ampliamente distribuida a nivel tisular, incluidos los del sistema endocrino y las células endocrinas.

La APB fue localizada con la catepsina L en vesículas secretoras que contenían neuropeptidos (encefalinas y NPY), denominados gránulos cromafínicos, en la medula adrenal bovina. Estas vesículas tienen actividad proteasica, utilizada en los procesos proteolíticos de los proneuropeptidos y protohormonas para la producción de neuropeptidos activos, incluyendo encefalinas, galanina, péptido intestinal vasoactivo (VIP), somatostatina y otros (Fricker 1988; Hook y cols., 1994, 2004; Azaryan y cols., 1995; Hill y cols., 1995; Hook y Yasothornsrikul 1998; Yasothornsrikul y cols., 1999, 2003; Goumon y cols., 2000; Taupenot y cols., 2003) Además la APB esta presente en las vesículas secretoras hipofisarias, que convierten la proopiomelanocortina (POMC) en hormona adrenocorticotropa (ACTH), hormona estimulante de los melanocitos (MSH), y  $\beta$ -endorfinas (Gainer y cols., 1984, 1985; Loh y cols., 1985; Parish y cols., 1986; Miller y cols., 2003). La expresión de la APB fue observada en cerebro, páncreas, corazón y otras regiones del tejido endocrino. Estos resultados demuestran la localización de la APB en vesículas secretoras y tejidos neuroendocrinos productores de encefalinas y otros péptidos.

La APB esta implicada en varios procesos patológicos. El etanol modula la actividad Arg-aminopeptidasa en las sinapsis neuronales, que producen y segregan neuropeptidos activos (Mayas y cols., 2004). La bestatina, un inhibidor de la AP-B, reduce el consumo de alcohol en ratas (Szczepanska y Grupp 1993). La administración de la bestatina en los cerebros de ratas eleva la presión sanguínea y la frecuencia cardiaca (Chan y cols., 1987), lo cual puede ser asociado a neuropeptidos. Además el crecimiento celular puede ser suprimido por inhibidores de la APB en células de coriocarcinoma (Ino y cols., 1991) y en células B inmunológicas (Morikawa y cols., 1989). La regulación de la AP-B en los sistemas celulares neuroendocrinos implica también el control de neuropeptidos. (Hwang y cols., 2007).

Una aminopeptidasa B ha sido purificada en extractos homogeneizados de testículo de rata. Presenta un 33% de identidad y un 48% de similitud con el leucotrieno-A4 hidrolasa, una relación reforzada por la capacidad de Ap-B para hidrolizar leucotrieno A4. AP-B y su ARNm se detectaron en la línea germinal y en las células de Sertoli y peritubulares de los túbulos seminíferos. Mediante inmunohistoquímica, la aminopeptidasa-B resultó ser particularmente abundante en los túbulos seminíferos en las últimas etapas de la espermatogénesis y fue claramente detectado en una zona restringida de espermátidas alargadas, concentrándose masivamente en los cuerpos residuales. Debido a que la enzima se encontró en el medio conteniendo espermaticitos y espermátidas y en el acrosoma durante la formación de los espermatozoides, se ha sugerido una implicación

de este exometallopeptidase en los mecanismos de procesamiento de proproteínas y propéptidos en el curso de la diferenciación espermática (Cadel y cols., 1997).

### **6.7. Aminopeptidasa A (APA, Aminopeptidasa ácida, E.C.304.11.7)**

APA es una  $Zn^{2+}$  aminopeptidasa unida a membrana de 160 kDa que rompe los residuos N-terminales glutamilo o aspartilo de los sustratos peptídicos (Nagatsu y cols., 1970; Wilk y Healy, 1993). La Aminopeptidasa A se expresa en muchos tejidos, especialmente en el borde en cepillo de las células del epitelio intestinal y renal, y en el endotelio vascular (Lojda y Gossrau, 1980), y se ha identificado en varios núcleos cerebrales de rata, sensibles a Angiotensinas e involucrados en la regulación de la tensión arterial (Zini y cols., 1996).

En humanos, se ha demostrado su presencia en varias regiones cerebrales, presentando la máxima actividad en el plexo coroideo y la glándula pineal, así como en el bulbo raquídeo dorso medial, en el tabique, la corteza prefrontal, el bulbo olfatorio, el núcleo accumbens, y el hipotálamo, sobre todo en los núcleos paraventricular y supraóptico donde se detectó una actividad alta (de Mota y cols., 2008).

Esta peptidasa es activada por  $Ca^{2+}$  con los sustratos glu- $\beta$ -naftilamida y asp- $\beta$ -naftilamida. Así mismo, la hidrólisis de glu- $\beta$ -naftilamida pero no la de asp- $\beta$ -naftilamida es también activada por iones  $Ba^{2+}$ . La actividad de la aminopeptidasa ácida citosólica es inhibida por quelantes metálicos (EDTA y 1,10 fenantrolina) y tioles (DTT: ditioneitol) (McDonnell y cols., 1997; Sanderink y cols., 1988).

La Aminopeptidasa A convierte la angiotensina II en angiotensina III, rompiendo el N-terminal de aminoácidos ácidos (aspartato), sirviendo como paso limitante en el metabolismo de la Angiotensina II. La aminopeptidasa A, regula el sistema renina angiotensina intrarrenal, estando distribuida en la superficie de las células endoteliales glomerulares, mesangiales y podocitos a lo largo de la nefrona, teniendo la más alta expresión en el túbulo proximal renal. Además, la Aminopeptidasa A es uno de los péptidos efectores principales del sistema renina angiotensina cerebral, ejerciendo un efecto tónico estimulante sobre el control de la presión arterial, habiéndose establecido líneas de investigación, en busca de fármacos

antihipertensivos por bloqueo de esta aminopeptidasa (Bodineau y cols., 2008).

Componentes del RAS se han encontrado en los testículos, epidídimo, conductos deferentes, próstata y semen. Las funciones del RAS en los procesos locales en estos sitios, son todavía inciertos y aún no se han dilucidado totalmente, aunque hay pruebas de la participación en la contractilidad tubular, la espermatogénesis, la maduración de espermatozoides, la capacitación, la exocitosis acrosomal y la fertilización (Leung y Sernia, 2003).

## **7. PÉPTIDOS BIOACTIVOS. SU PAPEL EN LA REPRODUCCIÓN.**

### **7.1. Péptidos opioides endógenos**

#### **7.1.1. Precursores de los péptidos opioides**

Uno de los grupos peptídicos más estudiados en los últimos años han sido sin duda los péptidos opioides endógenos, por su participación en diversos procesos fisiológicos. Estos péptidos se sintetizan a partir del procesamiento de sus precursores, codificados por cuatro tipos de genes diferentes: pro-enkefalina, pro-opiomelanocortina, pro-dinorfina y pro-nociceptina (Cesselin y cols., 1995; Mollereau y cols., 1996) (Figura 11). La mayoría de los dominios de péptidos opioides se encuentran flanqueados en sus precursores por pares de residuos de aminoácidos básicos (cada Lys-Arg, Lys-Lys o Arg-Arg) por donde escinde una enzima carboxipeptidasa para dar lugar al péptido bioactivo (Hughes y cols., 1983). (Figura 19)

**Proencefalina (PENK)** (Comb y cols., 1982). La PENK, también llamada proencefalina A, contiene siete secuencias de péptidos opioides: 4 copias de met-enkefalina y una copia de leu-enkefalina, de met-enkefalin-Arl-Phe<sup>7</sup>, de met-enkefalin Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup> y de sinencefalina.

**Proopiomelanocortina (POMC)** (Nakanisi y cols., 1979). La POMC, a parte de contener el péptido opioide  $\beta$ -endorfina, es precursor de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), de la  $\alpha$  y  $\beta$ -lipotropina (LPH) y de la  $\alpha$  y  $\beta$ -melanotropina (MSH) entre otros.

**Prodinorfina (PDYN)** (Kakidini y cols., 1982). Cada molécula de pro-dinorfina contiene tres secuencias de leu-encefalina y otros péptidos de mayor tamaño como las neo-endorfinas y las dinorfinas A y B.

**Pronociceptina (PNOC)** (Mollereau y cols., 1996). El gen que codifica para la PNOC presenta una alta homología con los genes que codifican PENK, POMC y PDYN sugiriendo un origen evolutivo común. Cada molécula de PNOC contiene una única copia de nociceptina, siendo su procesamiento similar al de resto de péptidos opioides.

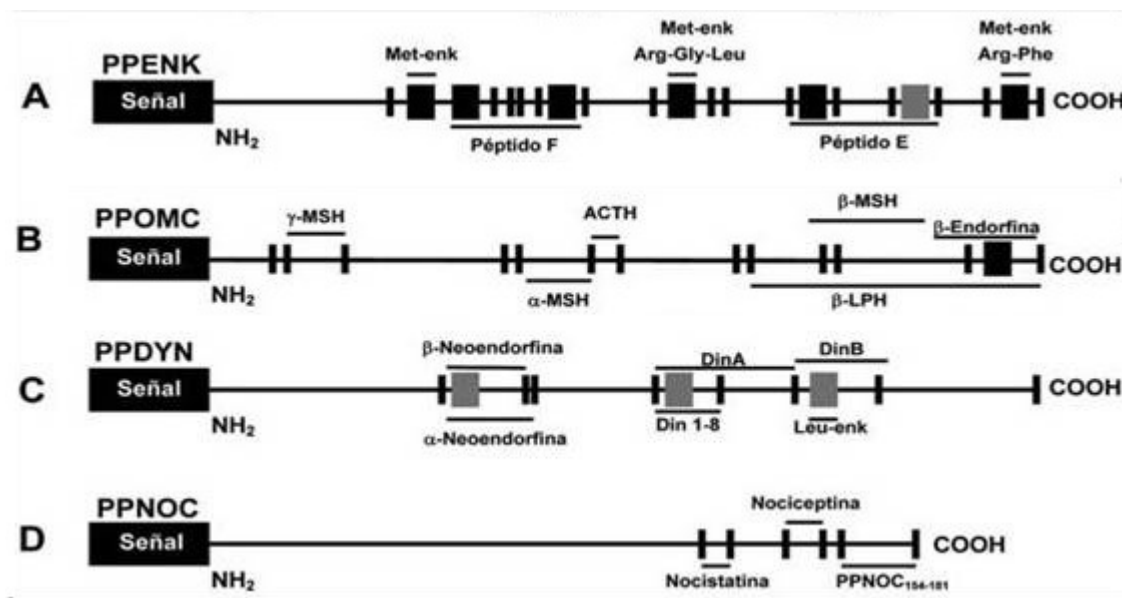


FIGURA 19.- Precursores de opioides endógenos.

### 7.1.2. Péptidos opioides endógenos

Hasta la actualidad existen al menos 20 péptidos opioides. Todos ellos, excepto la nociceptina y la endomorfin, poseen una secuencia aminoacídica común en el extremo amino terminal (*Tyr-Gly-Gly-Phe-Met/Leu*),



Los péptidos opioides muestran una afinidad diferencial por sus receptores. La met y la leu-encefalina son consideradas ligandos endógenos del receptor DOR. Presentan mayor afinidad por dicho receptor, aunque también son capaces de unirse al MOR con menor afinidad. Las  $\beta$ -endorfinas se unen a MOR y DOR con afinidad similar mientras que las dinorfinas se unen principalmente al KOR. La nociceptina fue descrita como ligando endógeno del receptor ORL<sub>1</sub>, siendo prácticamente incapaz de activar DOR, MOR ni KOR (Pan y cols., 1996).

### **7.1.3. Acciones fisiológicas de los péptidos y sus receptores**

La acción más conocida de los opioides endógenos es la supresión del dolor o analgesia, aunque en la actualidad se conocen diferentes funciones fisiológicas entre las que se encuentran: 1) la intervención en el desarrollo cerebral y los fenómenos de regeneración y plasticidad, pudiendo intervenir incluso en funciones superiores tales como la memoria y el aprendizaje, 2) la regulación de funciones sensoriales, 3) la producción de cambios en el comportamiento alimentario, 4) la modulación de enfermedades mentales como la ansiedad y/o la depresión, 5) la implicación en la función gastrointestinal, renal y hepática, 6) la modulación de la respuesta cardiovascular y la presión sanguínea, 7) la modulación de la respiración, produciendo deficiencias respiratorias y de las respuestas termorreguladoras, 8) la modulación de las respuestas inmunes, concretamente inmunosupresión, 9) la regulación de la locomoción y de la actividad general y, finalmente, 10) la regulación de la función reproductora (Bodnar, 2007).

### **7.1.4. Implicación del Sistema Opioide en la fertilidad masculina**

Los péptidos opioides están presentes en distintos órganos y tejidos del aparato reproductor masculino y femenino, lo que se sugiere que puedan ser capaces de regular la función reproductora interviniendo en múltiples procesos (Fabbri y cols., 1989).

#### **a. Control de las hormonas reproductoras mediante los opioides**

El primer punto de control que los opioides ejercen en la función reproductora es a través del eje hipotálamo-hipofisario, controlando la

liberación de las hormonas sexuales. La hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona leutinizante (LH) son secretadas por la hipófisis anterior y actúan directamente en los testículos estimulando las células somáticas que contribuyen a la espermatogénesis. La síntesis y liberación de ambas hormonas reproductoras está controlada hipotalámicamente por la hormona liberadora gonadotrópica (GnRH). La principal función de la FSH es la de estimular la proliferación de las células de Sertoli durante la pubertad donde se expresa exclusivamente el receptor de la FSH (Rannikki y cols., 1995). Mientras, la LH regula la síntesis de testosterona de los testículos en adultos, actuando sobre las células de Leydig donde se expresa principalmente el receptor de la LH (Heckert y Griswold, 2002). Además, también se ha detectado una ligera expresión del receptor de la LH en las células espermatogénicas (Eblen y cols., 2001; Lei y cols., 2001).

Los péptidos opioides controlan la función reproductora actuando en el sistema nervioso. La adición de morfina está asociada con una supresión de la liberación de LH y, antagonistas opioides como la naloxona y la naltrexona, producen un incremento de los niveles séricos de LH en humanos y numerosas especies animales (Cicero y cols., 1979; Sirinathsinghji y cols., 1983; Fraioli y cols., 1985). Sin embargo, la supresión de la liberación de LH, por los péptidos opioides, es de acción hipotalámica ya que por un lado, la liberación de la LH basal ó estimulada por GnRH no se ve alterada por la acción de la naloxona en hemipituitarias de rata (Wilkes y cols., 1981) y, por otro lado, tratamientos *in vivo* con antagonistas de GnRH bloquean completamente la liberación de GnRH inducida por naloxona (Wilkes y cols., 1981; Blank y Roberts, 1982). En base a estos estudios, se sabe que los péptidos opioides regulan la función reproductora desde el sistema nervioso central al inhibir la secreción de la GnRH (Delitala y cols., 1981, Fraioli y cols., 1982; Sirinathsinghji y cols., 1983; Gandarias y cols., 1993, Gandarias y cols., 1996).

## **b. Control de la función testicular por los opioides**

La espermatogénesis, además de estar regulada por mecanismos endocrinos del eje hipotálamo-hipofisario, está controlada por mecanismos paracrinos y autocrinos entre los diferentes tipos celulares presentes en los testículos.

Las células de Sertoli proporcionan un soporte metabólico y estructural necesario para la diferenciación de las células germinales.

Un fallo funcional del receptor de la FSH produce una disminución del tamaño de los testículos, debido a una disminución del número de células de Sertoli (Dierich y cols., 1998). Los hombres con dicho fallo funcional, presentan anomalías espermatogénicas y producen sémenes con oligozoospermia y teratozoospermia, aunque pueden ser fértiles. (Tapanainen y cols., 1997).

Las células de Leydig son las responsables de la producción de testosterona testicular. La testosterona y sus metabolitos (dihidrosterona y estradiol) son las hormonas sexuales masculinas que regulan principalmente la función reproductora. Los niveles de testosterona en el túbulo seminífero son 100 veces mayores que en sangre periférica (Morse y cols., 1973) y son necesarios para que se produzca una correcta espermatogénesis. Dicha concentración de testosterona intratesticular se alcanza, por un lado, gracias a la producción de testosterona cerca de los túbulos, en las células de Leydig estimuladas por la LH; y por otro lado, a la síntesis de ABP (androgen-binding proteína) en las células de Sertoli estimulada por la FSH, que transporta la testosterona hacia el lumen del túbulo seminífero (Hansson y cols., 1973; Ritzén y cols., 1975; Huang y cols., 1991).

Los péptidos opioides están presentes en los testículos y regulan la función testicular participando como mediadores en dicha comunicación intercelular. Los péptidos opioides ejercen su acción a través de la activación de los receptores opioides. Estudios de *binding* detectaron los tres tipos de receptores opioides, DOR, MOR y KOR, en testículos de rata, aunque su localización es exclusivamente en las células de Sertoli (Fabbri y cols., 1985; Zhou y cols., 1990).

Además, debido a que los genes que codifican para los precursores opioides PENK, POMC y PDYN se expresan también en los testículos de rata y ratón, la función testicular puede ser regular mediante la síntesis *de novo* de los péptidos opioides (Pintar y cols., 1984; Chen y cols., 1986; Kilpatrick y cols., 1986; Douglass y cols., 1987). Por otro lado, la sobreexpresión de PENK en testículos de ratones transgénicos, tiene como resultado ratones con fertilidad reducida, testículos morfológicamente anormales y baja movilidad espermática, sugiriendo que el sistema opioide podría estar implicado en la regulación de la espermatogénesis (O'Hara y cols., 1994).

Los genes que codifican los precursores opioides poseen una expresión diferencial en las células germinales y en las células somáticas de los testículos. (Garret y cols., 1989). En ratas y ratones,

la PENK presenta transcritos de diferente tamaño que se expresan de manera diferencial en las células germinales y las células somáticas de los testículos (Garret y cols., 1989). Las células germinales del testículo presentan un transcrito de mayor tamaño de la PENK de 1,7 kb que se expresa bajo un promotor específico (Kilpatrick y cols., 1990), mientras que las células de Leydig, las células de Sertoli y las células peritubulares expresan un mRNA de menor tamaño (1,45 kb) (Kilpatrick y cols., 1985; Kilpatmck y cols., 1987; Kew y cols., 1989; Garret y Douglas 1989; Yoshikawa y cols., 1988; Yoshikawa y cols., 1989). Ambos transcritos presentan intacta la secuencia codificante y difieren en la región 5' no codificante (Kilpatrick y cols., 1990). Sin embargo, perfiles polisómicos indican que el transcrito específico de la PENK que se expresa en células germinales no se traduce eficientemente y que es el mRNA de menor tamaño de las células de Leydig el principal responsable de la síntesis *de novo* de péptidos opioides en los testículos (Kew y cols., 1989). Esto explicaría el hecho de que la concentración de productos derivados de la PENK detectados en homogenados de testículos de rata sea relativamente baja (< 2 pmol/g) si se compara con los niveles de mRNA detectados para el gen de la PENK (Kilpatrick y cols., 1985). Sin embargo, las células de Sertoli también contribuirían a la síntesis *de novo* de los péptidos derivados de la PENK en los testículos, puesto que en células de Sertoli en cultivo, la expresión del gen de la PENK y los niveles de met-enkefalina se incrementan por la acción de la FSH (Kew y Kilpatrick, 1989). Además, Metha y colaboradores (1994) han observado que, durante la espermatogénesis, la expresión del corto transcrito de 1,45 kb de la PENK está regulada a la baja en las células intersticiales de los testículos, coincidiendo con la aparición de los espermatozoides paquitenos. Por tanto, dichos autores han sugerido que las células germinales podrían regular los niveles de péptidos opioides durante la espermatogénesis controlando la expresión de la PENK en las células vecinas.

Estudios mediante hibridación *in situ* demostraron que el gen que codifica para la POMC se expresa en las células de Leydig (Pintar y cols., 1984) y en las células germinales (Kilpatrick 1987). En testículos de ratón, el transcrito de POMC presenta dos formas de diferente tamaño. Un transcrito largo de unos 675-750 nucleótidos que se expresa principalmente en las células de Leydig y en algunos estadios de células germinales, y un transcrito de menor tamaño que se expresa específicamente en espermatozoides paquitenos. Como ocurre con los transcritos de PENK, los transcritos de las células de Leydig son los responsables de sintetizar los péptidos derivados de la POMC, mientras que el mRNA de la POMC presente en la espermatogénesis se

traduce de manera menos eficiente (Kilpatrick y cols., 1987). Esto concuerda con estudios anteriores donde la  $\beta$ -endorfina, principal péptido opioide generado por el procesamiento de la POMC, se ha inmunodetectado en las células de Leydig de numerosas especies (Tsong y cols., 1982). La síntesis de  $\beta$ -endorfina en las células de Leydig está controlada, por un lado, hormonalmente, mediante la acción de la LH secretada de la hipófisis en ratas adultas (Chen y cols., 1987) y, por otro lado, localmente, mediante la acción del factor CRF (corticotropin-releasing factor). El CRF regula autocrinamente la función de las células de Leydig (Audhya y cols., 1989; Ulisses y cols., 1990) donde se expresa específicamente su receptor (Ulisses y cols., 1989) y cuya producción es estimulada por la LH. Los niveles de  $\beta$ -endorfina se incrementan en células de Leydig en cultivo tras la estimulación por CRF y dicho efecto es revertido completamente en presencia del antagonista  $\alpha$ -hélice CRF (Eskeland y cols., 1989).

A pesar de que su síntesis *de novo* tiene lugar principalmente en las células de Leydig, los péptidos opioides no ejercen ningún efecto en la producción de testosterona basal o estimulada por hCG, ni en células de Leydig en cultivo, ni en tejido testicular de rata (Scher y cols., 1982; Margiooris y Liotta, 1986; Fabbri y cols., 1986). Estudios de *binding* no demuestran la presencia de los receptores opioides en las células de Leydig (Fabbri y cols., 1988), confirmando dichos resultados. Sin embargo, en ratas, la administración intratesticular de los antagonistas opioides naloxona y nalmefene, desciende la secreción basal de testosterona y reduce los niveles séricos de testosterona (Gerendai y cols., 1986), sugiriendo que los péptidos opioides puedan regular indirectamente la secreción de testosterona.

Por otra parte, mediante una acción paracrina, la  $\beta$ -endorfina sintetizada en las células de Leydig produce un efecto inhibitorio de la función de las células de Sertoli (Gerendai y cols., 1986). Esto es consistente con el hecho de que los receptores opioides han sido descritos sólo en las células de Sertoli (Fabbri y cols., 1985; Zhou y cols., 1990). Concretamente, la  $\beta$ -endorfina inhibe la producción de ABP estimulada por la FSH en las células de Sertoli y dicha inhibición es revertida en presencia de naloxona (Fabbri y cols., 1985). La ABP sintetizada en las células de Sertoli regula los niveles de testosterona intratubular necesarios para una correcta espermatogénesis al transportar la testosterona hacia el lumen del túbulo seminífero (Hansson y cols., 1973; Ritzén y cols., 1975; Huamg y cols., 1991). Además de regular indirectamente los niveles de testosterona intratubular controlando la producción de ABP en las células de Sertoli, se ha observado que la  $\beta$ -endorfina endógena, sintetizada en los

testículos, inhibe la proliferación y diferenciación de las células de Sertoli estimuladas por FSH (Orth y cols., 1986) y que, el tratamiento *in vivo* con el antagonista opioide nalmefene estimula la producción de ABP en testículos de ratas neonatas (Gerendai y cols., 1986). Por tanto, los péptidos opioides, además de inhibir la función de las células de Sertoli, podrían mantener en estado quiescente la maduración sexual de los testículos al inhibir la proliferación y desarrollo de las células de Sertoli antes de la pubertad (Fabbri y cols., 1985).

En lo que se refiere a la PDYN, a consecuencia de un *splicing* alternativo del mensajero, el transcrito de PDYN presente en testículos de rata es de menor tamaño que el descrito en cerebro. El corto transcrito de 65 nucleótidos posee inalterada la secuencia codificante de la proteína y, perfiles polisómicos, indican que el mRNA testicular de la PDYN se traduce eficientemente, al igual que el transcrito de mayor tamaño presente en el cerebro (Garrett y cols., 1989). Esto es consistente con la presencia de los péptidos dinorfina A y dinorfina B en extractos testiculares (Douglas y cols., 1987). Dicho precursor, se expresa y se traduce principalmente en las células de Sertoli. Debido a que productos derivados de la PDYN han sido inmunolocalizados en las células de Sertoli (Collard y cols., 1990) y en el compartimento intersticial de testículos de rata, se ha sugerido que las dinorfinas pueden ser secretadas y regular autocrinamente la función de las células de Sertoli (Douglas y cols., 1987).

En resumen, los péptidos opioides están presentes en diferentes células de las gónadas masculinas pudiendo intervenir en los mecanismos que regulan la espermatogénesis. Los precursores opioides se expresan de manera diferencial en las células somáticas y germinales de los testículos indicando que los péptidos opioides pueden regular localmente la función testicular mediante su síntesis *de novo*. Concretamente, las gonadotropinas y el factor CRF estimulan, en las células de Leydig, la producción de los péptidos opioides que inhiben paracrinamente la función de las células de Sertoli.

### **c. Control de la función espermática por los opioides**

La presencia de los receptores opioides DOR, MOR y KOR en la membrana espermática humana (Agirregoitia y cols., 2006) indica que los péptidos opioides podrían regular la función reproductora ejerciendo un efecto directo sobre los espermatozoides. En semen, además, se han descrito otros componentes del sistema opioide. Diferentes péptidos opioide, como las encefalinas y las endorfinas,

están presentes en líquido seminal y su concentración es entre 6-12 veces mayor que la detectada en plasma sanguíneo (Sharp y cols., 1981). Se ha detectado también inmunoreactividad de la met-enkefalina, la leu-enkefalina y la  $\beta$ -endorfina (Sastry y cols., 1982) en espermatozoides, y productos del precursor PENK se han inmunolocalizado en la región acrosómica (Kew y cols., 1990).

Los péptidos opioides parecen estar implicados en la movilidad espermática, aunque los resultados encontrados hasta la actualidad son contradictorios. Por un lado, la movilidad espermática desciende en presencia de altas concentraciones de encefalinas y en presencia de la  $\beta$ -endorfina (Fraïoli y cols., 1982, Sastry y cols., 1991). Además, se ha visto que, análogos sintéticos de la met-enkefalina (DAMME) produjeron también un descenso de la movilidad espermática debido a una reducción en el consumo de  $O_2$ , sin afectar en la viabilidad del espermatozoide (Foresta y cols., 1985). Sin embargo, otros autores han observado que las encefalinas a bajas concentraciones son necesarias para mantener la movilidad espermática (Fujisawa y cols., 1992). Finalmente, algunos estudios, incluso, no detectan efecto alguno de la met-enkefalina sobre la movilidad espermática (Fraïoli y cols., 1985). Agirregoitia y colaboradores (2006) han propuesto que el efecto bivalente de los opioides pueda ser debido a la activación de distintos receptores ya que la incubación de espermatozoides humanos con morfina (agonista del receptor  $\mu$ -opioides) o con naltrindol (antagonista del receptor  $\delta$ -opioides) inhibe la movilidad espermática. Además, la naloxona, antagonista con afinidad diferencial por los receptores opioides, modula la movilidad dependiendo de la dosis del antagonista utilizada (Albrizio y cols., 2005; Mari y cols., 2005). Aunque el efecto de los péptidos opioides es contradictorio, algunos autores sugieren que un nivel adecuado de encefalinas sería necesario para el mantenimiento de la movilidad espermática ya que pacientes con déficit en la movilidad espermática (astenozoospermia) presentan unos niveles de met-enkefalina significativamente menores en su plasma seminal (Fujisawa y cols., 1996).

Como hemos comentado anteriormente, las células espermáticas del eyaculado no son capaces de fertilizar y necesitan ser activadas y capacitadas para llevar a cabo la fecundación del ovocito una vez se produzca la reacción acrosómica. En estudios *in Vitro* de espermatozoides de caballo, se ha visto que la naloxona induce la capacitación sin afectar a la reacción acrosómica (Albrizio y cols., 2005). Sin embargo, otros estudios demuestran que el DAMME, un análogo de la met-enkefalina, inhibe la reacción acrosómica espontánea de manera dosis-dependiente (Foresta y cols., 1985).

Actualmente, no hay estudios suficientes que relacionen al sistema opioide en éstos procesos.

## **7.2. Otros péptidos de interés**

### **7.2.1. TRH (thyrotropin-releasing hormone)**

La hormona liberadora de tirotrópina (TRH) fue inicialmente descubierta como un neuropéptido sintetizado en el hipotálamo, que actúa como regulador del eje hipotálamo hipofisario, y controla la secreción y liberación de tirotrópina que a su vez estimula la síntesis y liberación de la hormona tiroidea. Los receptores para esta hormona TRH incluyen receptor-1 (TRH-R1) y -2 (TRH-R2).

Ha sido localizado también, en otras regiones cerebrales y en otros tejidos como el páncreas, bazo, suprarrenal, región gastrointestinal y sistema reproductor masculino (Fuse y cols, 1990).

La hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y los péptidos relacionados se han encontrado en altas concentraciones en el semen humano. (Pekary y cols., 1990), y en el epidídimo (Pekary y cols., 1993), habiéndose descrito también altos niveles de TRH y de su precursor TRH-Gly en testículos de ratón, perro y hombre (Pekary y cols., 1983).

### **7.2.2. Angiotensina II**

El sistema renina-angiotensina (SRA) sanguíneo es fundamentalmente conocido por su papel en el mantenimiento de la presión arterial y la homeostasis de electrolitos y fluidos. La hormona efectora de este sistema es la Angiotensina II, pero en años recientes se ha comprobado su presencia en numerosos tejidos, donde se ha observado la producción de péptidos activos como Angiotensina II y a veces III y IV, con actividad paracrina similar o diferente a la ejercida por el SRA circulante. Estos tejidos incluyen glándula suprarrenal, riñón, cerebro, páncreas y sistema cardiovascular. (Gupta y cols., 1995; Mulrow, 1998; Vinson y Ho, 1998; Bader y cols., 2001; Varagic y Frohlich, 2002; MacKenzie y cols., 2002; McKinley y cols., 2003; Leung y Carlsson, 2005).

Actualmente existen evidencias de que la funcionalidad del aparato reproductor masculino depende de la presencia de un sistema



renina angiotensina local. Se ha observado infertilidad en animales carentes de los genes que codifican componentes SRA, como el enzima de conversión de la angiotensina (ECA) o angiotensinógeno (Hagaman y cols., 1998). Además, la distribución de los componentes de RAS, los receptores y las actividades de la angiotensina asociados demuestran funciones que están exclusivamente relacionadas con el proceso reproductivo (Leung y Sernia, 2003; Saridogan y cols, 1996).

El sistema reproductor masculino presenta varios lugares de actividad RAS intrínseca. De hecho, todos los componentes de RAS se han localizado morfológica y topográficamente. Se ha demostrado que son sensibles a los andrógenos y a la hipoxia, y que la angiotensina tiene influencia tubular y, por consiguiente, de secreción de fluidos.

Componentes del RAS se han encontrado en los testículos, epidídimo, los conductos deferentes, la próstata y el semen. Receptores de la angiotensina II tipo 1 y, en menor medida, de tipo 2 están muy extendidos, y receptores de la angiotensina IV, han sido localizados en la próstata. La angiotensina II se encuentra también en el plasma seminal, además en concentraciones mas elevadas que en la sangre, aunque no existen variaciones en cuanto al numero de espermatozoides y su movilidad (O'Mahony y cols., 2000). Las funciones del RAS en los procesos locales de los sitios antecitados son todavía inciertos y aún no se han dilucidado totalmente, aunque hay pruebas de la participación en la contractilidad tubular, la espermatogénesis, la maduración de espermatozoides, la capacitación, la exocitosis acrosomal y la fertilización. (Vinson y cols., 1995; O'Mahony y cols., 2000 Fraser y cols., 2001).

### **7.2.3. Taquicininas y Sustancia P**

Las Taquicininas comprenden una familia de péptidos cuyos miembros mejor conocidos en los mamíferos son la sustancia P (SP), neurocinina A (NKA), neurocinina B (NKB) y hemokinin-1 (HK-1). Son péptidos vasoactivos que contraen el músculo liso.

Las Taquicininas afectan a las funciones reproductivas, actuando tanto a nivel central como periférico. Estos péptidos modulan la secreción de de las diferentes hormonas en el hipotálamo y la pituitaria anterior y modifican la función del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal, tanto en hombres como en mujeres (Debeljuk y Lasaga, 1999; Candenias y cols., 2005). A nivel periférico, las taquicininas, clásicamente consideradas como neuropéptidos, están

presentes en las neuronas capsaicina-sensibles que abastecen al tracto genital masculino y femenino (Traurig y cols., 1984; Debeljuk y cols., 2003; Pennefather y cols., 2004). Además, se expresan en muchos tipos diferentes de células reproductivas no neuronales (Chiwakata y cols., 1991; Lowry, 2003; Page y cols., 2003; Patak y cols., 2003; Pintado y cols., 2003).

Las Taquicininas han sido localizadas en las fibras nerviosas de los testículos, en células de Leydig de diferentes especies animales, y también en las células de Sertoli de los testículos del hámster siberiano. Las Taquicininas inhiben la liberación de testosterona en los testículos o en fragmentos aislados de células de Leydig *in vitro*. Estimulan la liberación de lactato y transferrina y la actividad de la aromatasas en células de Sertoli *in vitro*. Ambas líneas celulares expresan el gen Preprotaquicinina, y este hecho sugiere que las taquicininas se pueden sintetizar en los testículos. Estos hallazgos sugieren que las taquicininas podrían tener una función fisiológica en los testículos como moduladores de las funciones de los diferentes tipos de células contenidas en estos órganos (Debeljuk y cols., 2003)

La presencia de la sustancia P (SP) ha sido demostrada en el eyaculado humano y en el plasma seminal. (Debeljuk y cols., 2003; Sastry y cols., 1991) informaron que la SP causa efectos tanto de inhibición como de estimulación sobre la motilidad del espermatozoide humano

Recientemente se ha demostrado que las Taquicininas causan incremento dosis- dependiente en la proporción de espermatozoides de movilidad progresiva, produciendo una disminución paralela del porcentaje de espermatozoides móviles no progresivos en muestras seminales incubadas con taquicininas. Estos efectos se mantenían durante varias horas y dependían de la motilidad inicial y fueron más pronunciados cuando menor fue la movilidad inicial, siendo el péptido SP la taquicinina más activa, en términos de potencia y efecto máximo

Los receptores para Taquicininas (NK1, NK2, NK3) han sido demostrados en el acrosoma, pieza intermedia y flagelo del espermatozoide, así como el RNAm de los genes que codifican la sustancia P/neuroquinina A (TAC1), neuroquinina B (TAC3) y hemoquinina 1 (TAC4) Estos datos apoyan la propuesta de que las taquicininas podrían actuar como moléculas de señalización intercelular y de estar implicadas en los procesos de reproducción y fertilización. (Ravina y cols., 2007; Pinto y cols., 2010).

#### 7.2.4. FPP (Fertilization Promoting Peptide)

El FPP (Peptido Promotor de la Fertilización; pGlu-Glu-ProNH<sub>2</sub>), es un tripéptido relacionada estructuralmente con la hormona liberadora de tirotropina, producido por la próstata y liberado en el plasma seminal.

En el plasma seminal humano, El FPP se encuentra en concentraciones de ~50 nmol / l (Fraser y Adeoya-Osiguwa, 2001), superiores por ello a las observadas en el plasma sanguíneo. Regula la vía adenilato ciclasa (AC) / CAMP estimulando inicialmente y luego inhibiendo la producción de cAMP (Monks y cols., 1986; Fraser y Adeoya-Osiguwa, 1999; Adeoya-Osiguwa y Fraser, 2002, 2003).

El TCP11, receptor para la FPP, esta localizado en la cabeza del acrosoma y en el flagelo, principalmente en la pieza principal del espermatozoide de ratón (Fraser y cols., 1997). En el espermatozoide humano, se ha identificado un receptor similar: el gene *Tcp11* (Ragoussis y cols., 1992) con una distribución similar a la encontrada en el ratón (M.Tahmasebi, personal communication in Fraser, 2004).

Estimula la capacitación y la capacidad fertilizante de los espermatozoides no capacitados de ratón y cerdo, mientras que inhibe la reacción acrosómica en los espermatozoides capacitados (Fraser y cols., 2001; Funahashi y cols., 2000).

#### 7.2.5. Bombesina

La bombesina es un tetradecapeptido aislado de la piel de la rana europea *bombina* *bombina* (Anastasy, 1971). La Bombesina y sus péptidos relacionados constituyen una familia de neuropéptidos comunes en muchas especies de vertebrados.

En términos de sus semejanzas estructurales, originalmente fueron divididos en tres grupos generales: El grupo de bombesina, en el que todos tienen un extremo carboxilo de Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub> (bombesina, alytesin, y [pGlu<sup>1</sup>] bombesina<sub>6-14</sub>), el grupo ranatensina, que tenía un extremo carboxilo de Gly-His-Phe-Met-NH<sub>2</sub> (ranatensin, ranatensin R y C, litorin, rodhei-litorin, y [Glu (OTE),<sup>2</sup> o (OME)<sup>2</sup>] litorin), y el grupo phyllolitorin, que tenía una Gly-Ser-Phe/Leu-Met-NH carboxilo-terminal de<sub>2</sub> (phyllolitorin, [Leu<sup>8</sup>] phyllolitorin, y [Thr<sup>5</sup>, Leu<sup>8</sup>] phyllolitorin) (Falconieri Erspamer y cols., 1988).

Posteriormente, en mamíferos, se han aislado dos péptidos similares a la bombesina: el péptido liberador de gastrina (GRP), un péptido de 27 aminoácidos aislado originalmente del estómago de cerdo, y que tiene en común con la bombesina los mismos siete aminoácidos carboxilo-terminal y una actividad biológica similar (McDonald y cols., 1979) y el neuromedin B (NMB), equivalente al ranatensin en los mamíferos y aislado de la medula espinal de la especie porcina (Minamino y cols., 1983) encontrándose ampliamente distribuidas en mamíferos, tanto en el sistema nervioso como en tejidos periféricos, especialmente en el tracto gastrointestinal (Penman y cols., 1983; Wada y cols., 1990; Battey y Wada, 1991; Spindel y cols., 1993; Moody y Merali, 2004).

En el tracto digestivo, el péptido liberador de gastrina (GRP-IR) se encuentra distribuido principalmente en las neuronas, así como en los plexos submucoso y mesentérico pero no en las células endocrinas (Penman y cols., 1983). En el sistema nervioso se encuentra en la medula espinal (tanto el cuerno posterior y anterior), en los núcleos hipotalámicos, prosencéfalo, y los núcleos medulares que participan en las funciones autónomas, así como en los núcleos sensoriales Sistema Nervioso Central (Panula y cols., 1982, 1988; Wada, 1990).

NMB-IR y su ARNm se encuentran en todo el tracto gastrointestinal, pero en general en niveles inferiores a GRP, excepto en el esófago (Spindel y cols., 1993). En general, en el cerebro y la médula espinal, la presencia de NMB-IR es mayor que GRP-IR (Minamino y cols., 1984), no superponiéndose la distribución de ambos péptidos en la mayoría de las regiones cerebrales (Ohki-Hamazaki y cols., 2005).

Los péptidos bombesina de mamíferos, GRP y NMB, demuestran un amplio espectro de respuestas farmacológicas y biológicas. **La GRP** estimula la contracción del músculo liso, tanto en el tracto gastrointestinal como en el sistema urogenital y tiene profundos efectos sobre la motilidad gastrointestinal, estimula la liberación de numerosas hormonas/neurotransmisores gastrointestinales, estimula la secreción y / o liberación de hormonas en el páncreas, estómago, colon, y numerosos órganos endocrinos. Además tiene potentes efectos sobre las células inmunes (macrófagos, células dendríticas, linfocitos y leucocitos)

Tiene potentes efectos en el crecimiento en tejidos normales y tumorales, así como potentes efectos en el SNC, incluyendo la regulación del ritmo circadiano, la termorregulación, la regulación de la

ansiedad y la respuesta de miedo, la regulación de la ingesta de alimentos y efectos en el comportamiento y participa en la mediación de numerosos efectos en el SNC en el tracto gastrointestinal

En muchos tejidos, los efectos de la **NMB** superponen con las de la GRP, sin embargo, NMB tiene efectos específicos en algunos tejidos como la contracción del músculo liso, los efectos del crecimiento en diferentes tejidos. Sus efectos sobre el SNC incluyen acciones sobre la alimentación, la termorregulación, la regulación de la liberación de TSH, la estimulación de diferentes neuronas del SNC, efectos sobre el comportamiento y efectos sobre la transmisión sensorial espinal

La GPR y, en menor medida NMB afecta el crecimiento y / o la diferenciación de un número importante de tumores humanos, incluyendo colon, próstata, pulmón y algunos cánceres ginecológicos (Jensen y cols., 2008).

Existen tres clases de receptores en mamíferos: El  $BB_1$ , con mayor afinidad al NMB, el  $BB_2$  que prefiere el GRP y el  $BB_3$  llamado receptor huérfano que tiene una afinidad del 47-52% con el GRPR y NMBR. En el mono, los niveles más altos del receptor  $BB_1$  se encontraron en los testículos y el estómago, así como en el SNC, incluyendo la amígdala, el núcleo caudado, el hipocampo, el hipotálamo, el tálamo, tallo cerebral y la médula espinal. En los monos, los niveles más altos del receptor  $BB_2$  se encuentran en el páncreas, y en menor proporción en la próstata, estómago y el músculo esquelético. En el SNC está ampliamente distribuido con las mayores cantidades en el hipotálamo, ganglios basales y laterales y núcleo del tracto olfativo. En el mono el receptor  $BB_3$  se encuentra en mayor cantidad en los testículos y en el SNC, en el hipotálamo, seguida por la glándula pituitaria, amígdala, el hipocampo y el núcleo caudado. En el tracto gastrointestinal, se ha detectado en los ganglios mesentéricos y submucosos y en las células intersticiales de Cajal (Sano y cols., 2004).

Se ha identificado un grupo de neuronas localizadas en la parte superior de la médula espinal lumbar, como las generadoras de la eyaculación, las cuales proyectan axones que contienen GRP en la parte inferior de la médula espinal lumbar y que inervan las regiones que controlan la erección y la eyaculación (Sakamoto y Kawata, 2009). La expresión de la GRP esta influida por los andrógenos (Sakamoto y Kawata, 2009).

Además, el GRP (homólogo mamífero de la bombesina), está ampliamente distribuido en las neuronas del tracto reproductivo,

(Sunday, 1988). En estudios *in vivo* sobre monos se ha sugerido que la GRP esta implicada en la mediación de la fertilidad (Giladi y cols., 1993), habiéndose identificado inmunoreactividad GRP en las células de Leyding de la rata adulta (Gnessi y cols., 1989). En diferentes especies de mamíferos, la activación del receptor GRP, produce una activación de la fosfolipasa C, la cual induce un incremento de fosfoinositoles y movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Rozengurt y cols., 1988; Wang y cols., 1992). El  $\text{Ca}^{2+}$  ha sido descrito como un factor esencial de la reacción acrosómica y de la movilidad espermática y de la unión a la zona pelúcida. Sin embargo, la incorporación de GRP *in vitro* a los espermatozoides no mostraron ningún efecto positivo de la GRP sobre la motilidad, capacitación, reacción acrosomal, la unión y la penetración de la zona pelúcida en las condiciones experimentales ensayadas. (Levy y cols., 1996).

Estudios *in vitro* e *in vivo* indican que la bombesina podría estar implicada en la modulación de la liberación de hormonas de la pituitaria, observándose un efecto estimulador en la liberación de LH y PRL, así como la liberación TSH de cultivos de células de la pituitaria (Baranowska, 2009).

### 7.2.6. Neurotensina

La Neurotensina (NT) es una neurohormona y / o neuromodulador de 13 aminoácidos, que se encuentra en las vesículas sinápticas y es liberado de las terminales neuronales de una manera  $\text{Ca}^{2+}$  -dependiente. Su ciclo metabólico subcelular implica un complejo precursor inactivo mayor (169 aminoácidos), cuya ruptura produce la activación de NT (Villeneuve y cols., 2002), así como una serie de endopeptidasas (Checler, 1994) (Vincent y cols., 1994), que catalizan extracelularmente su degradación proteolítica (Checler, 1994) Este péptido está presente entre las especies de mamíferos y no mamíferos, principalmente en el sistema nervioso central y el tracto gastrointestinal. Interactúa con la mayoría de los sistemas de neurotransmisores del SNC (Petrie y cols., 2005; Zahm y cols., 2001).

Hay tres receptores de NT conocidos ( $\text{NTS}_1$ ,  $\text{NTS}_2$ ,  $\text{NTS}_3$ ), Aparte del sistema nervioso central (SNC), donde se encuentran todos los tipos de TSNS. El  $\text{NTS}_1$  también se encuentra en el tracto gastrointestinal (TGI) y  $\text{NTS}_3$  también está presente en el corazón, los músculos esqueléticos, la glándula tiroides, la placenta y los testículos.  $\text{NTS}_1$  se expresa en diferentes cantidades por casi todos los núcleos del hipotálamo, y en particular por quienes participan en la regulación

neuroendocrina. A nivel de la hipófisis anterior, han sido identificados tanto NTS<sub>1</sub> como NTS<sub>2</sub>.

Debido a su actividad neuroendocrina, (Brown y Miller, 1982), se ha relacionado con la fisiopatología de una serie de trastornos, tales como la esquizofrenia, el uso indebido de drogas, la enfermedad de Parkinson, cáncer, trastornos de la alimentación y otras condiciones neurodegenerativas (Cáceda y cols., 2006). Por otra parte, participa en la fisiología de la inducción del dolor, control de la presión arterial y la inflamación St-Gelais y cols, 2006).

También desempeña un papel interactivo importante en todos los componentes del circuito hipotálamo-hipófisis anterior (Rostène y Alexander, 1997), o que es mediado por una actividad endocrina, paracrina y / o autocrina, para la mayoría de las regiones anatómicas que definen a este circuito. Parece ejercer una influencia estimulante, directa o indirecta sobre las células neurosecretoras hipotalámicas que sintetizan hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), dopamina (DA), somatostatina (SS), y la hormona liberadora de corticotropina (CRH). Ejerce una estimulación directa de la secreción de PRL en la pituitaria y la eminencia media anterior, (Memo y cols., 1986). Curiosamente, se ha sugerido que la NT interviene en la liberación de DA en las neuronas del hipotálamo, lo que conduce a la inhibición de la secreción de PRL (Pan y cols., 1992). Además, la NT participa en el control neuroendocrino de las hormonas tiroideas, regulando la función de la TRH y la secreción de TSH de manera autocrina y paracrina, cooperando con ellos en algunas de sus acciones metabólicas, tales como el ciclo estral, cambios dependientes del apetito y la suficiencia energética, así como de la gluconeogénesis (Stolakis y cols., 2010).

### **7.2.7. Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)**

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es un decapeptido segregado por las neuronas hipotalámicas, que juega un papel fundamental en la reproducción. Es liberada en forma pulsátil a la circulación portal hipofisaria y llega a las células gonadotropas de la pituitaria anterior. En las células gonadotropas, la GnRH se une a una sola clase de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) e inicia una serie de eventos fisiológicos que conducen a la síntesis y la liberación de gonadotropinas, la hormona luteinizante (LH) y hormona folículo-estimulante (FSH) en un proceso altamente coordinado. Tanto la LH como la FSH son liberados de forma pulsátil a la circulación sistémica,

controlando a su vez los procesos de la gametogénesis y la esteroidogénesis (Conn y Crowley, 1994; Stojilkovic y Catt, 1995).

Existen tres tipos de GNRH: GNRH- I hipotalámica, GNRH-II mesencefálica y GNRH-III telencefálica. De todos ellos, el péptido GnRH II es la que parece expresarse en su mayor parte en otros tejidos como el sistema reproductivo, habiéndose comprobado la presencia de receptores de tipo II en los tejidos reproductivos (por ejemplo, las gónadas, próstata, endometrio / placenta y las glándulas mamarias) (Millar y cols., 2001) aunque la función exacta de estas moléculas no hipotalámicas de GnRH aún no están bien definidas (Lescheid y cols., 1997; Gore, 2002 ; Leung y cols., 2003).

La frecuencia y la amplitud de la liberación de GnRH del hipotálamo es un paso crítico y limitante de la velocidad para el control y el mantenimiento de la secreción de gonadotrofininas hipofisarias. El pulso de la GnRH y los cambios de amplitud a su vez dependen del feedback ejercido por los esteroides sexuales gonadales y los péptidos producidos en todo el ciclo reproductivo (Shupnik, 1996). Tanto la síntesis de GnRH-R y la síntesis de LH se favorece a altas frecuencias del pulso de la GnRH (un pulso cada 30 minutos), mientras que la síntesis FSH se favorece a bajas frecuencias del pulso de la GnRH (un pulso cada 120 minutos) según lo observado por Kaiser y cols. (1997).

La expresión del ARNm de la GnRH se ha demostrado en los tejidos reproductivos humanos y líneas celulares (Dong y cols., 1993; 1996), gónadas de rata (Oikawa y cols., 1990; Bahk y cols., 1995), y células endometriales humanas (Raga y cols., 1999).. Estudios de hibridación *in situ* revelaron la localización del ARNm de la GnRH en las células de la granulosa de folículos primarios, secundarios y terciarios en el ovario (Whitelaw y cols., 1995). así como en las células de la granulosa (Minaretzis y cols., 1995; Kang y cols., 2000) y en el líquido folicular y plasma seminal humano [4,5] (Izumi y cols., 1985; Sokol y cols., 1985). Este material es, probablemente, sintetizado en las gónadas (Aten y cols., 1986; Sharpe y Fraser, 1980).

Se ha encontrado GnRH ARNm en las células tubulares seminíferas del tejido testicular, fetal y maduro de las ratas, así como en humanos ( Botte y cols., 1998; Petersson y cols., 1989) mientras que el ARNm de la GnRH-R se encuentra en las células intersticiales, incluidas las células de Leydig (Bahk y cols., 1995; Brekke y cols., 1985).

Recientemente, se ha encontrado GnRH-R-ARNm en las células germinales testiculares de los ratones (Bull y cols., 2000), en el



esperma humano maduro y en las células germinales postmeioticas, y se consideró que estaba estrechamente relacionado con la espermatogénesis, la maduración de espermatozoides, y la fertilización (Van Biljon y cols., 2002). Se ha sugerido que estas moléculas son probablemente sintetizadas en las gónadas (Oikawa y cols., 1990) y en la próstata (Azad y cols., 1993).

En consecuencia, hay varios lugares posibles a lo largo del tracto genital masculino y femenino donde los espermatozoides pueden interactuar con GnRH (GnRH o material similar): Durante la espermatogénesis con la GnRH producida por las células de Sertoli; durante la eyaculación, con la GnRH presente en el plasma seminal. Por último, durante su tránsito a lo largo del oviducto, los espermatozoides pueden interactuar con la GnRH transferidos por los productos de la ovulación, es decir, el líquido folicular y células de la granulosa, habiéndose comprobado un efecto directo de la GnRH sobre la capacidad de unión de los espermatozoides a la zona pelucida ovocitaria (Morales, 1998).

### **7.2.8. GnIH (Hormona Inhibidora de Gonadotropinas)**

La GnIH (hormona inhibidora de gonadotropina) es un dodecapeptido hipotalámico, recientemente descubierto también en la hipófisis de la codorniz. (Tsutsui y cols., 2000). El ortólogo de mamíferos de la GnIH aviar (RFamide péptido relacionado, RFRP) se expresa en las neuronas del núcleo dorsomedial del hipotálamo (DMH) en ratas, con fibras que se extienden tanto a la eminencia media y el área preóptica, haciendo contacto con la supuesta GnRH neuronas en el hipotálamo (Kriegsfeld y cols., 2006; Johnson y cols., 2007).

El RFRP se produce como un péptido precursor que se escinde en dos péptidos activos *in vivo*, RFRP-1 y RFRP-3 (12). (Kriegsfeld y cols., 2006). Las secuencias de aminoácidos de RFRP de rata son altamente homólogos a precursor GnIH aviar (12). El receptor de RFRP (conocido como OT7T022) es también similar a la del receptor de GnIH en las aves (14) (Yin y cols., 2005) y se encuentra en el hipotálamo, la pituitaria y los testículos (Hinuma y cols., 2000; Bentley y cols., 2008).

Actúa sobre la hipófisis y las neuronas GnRH hipotalámicas, disminuyendo la síntesis y liberación de gonadotropinas, e inhibiendo el desarrollo gonadal y su mantenimiento. El GnIH también ha sido identificado en el hipotálamo de los mamíferos. Resultados más recientes en aves y mamíferos indican que GnIH pueden operar a nivel

de las gónadas como un regulador de autocrina / paracrina de la esteroidogénesis y la gametogénesis. Es importante destacar que GnIH en aves y mamíferos parece actuar en todos los niveles del hipotálamo-hipófisis-gonadal (HPG), y posiblemente a diversos plazos (minutos / día). Así, GnIH y sus homólogos parecen actuar como neurohormona clave de control de la reproducción de vertebrados. (Tsutsui y cols., 2010).

Se ha observado que, tanto el estrés agudo como el crónico estimulan la expresión del RFRP (considerado un GnIH) en el hipotálamo de ratas macho adultas, junto con una reducción de los niveles plasmáticos de LH. En respuesta a la tensión, el hipotálamo libera CRH en el sistema portal hipofisario, después de que las células de la pituitaria anterior respondan a la CRH por la hormona liberadora de corticotropina (ACTH). La hormona ACTH estimula la corteza suprarrenal para liberar GCs en el torrente sanguíneo. Se ha demostrado que los receptores de las hormonas del estrés existen en las neuronas RFRP, proporcionando así la arquitectura neuroanatómica de los efectos mediados por el estrés en el sistema de RFRP, y depende de las hormonas suprarrenales (Kirby y cols., 2009).

El estrés ha sido relacionado con infertilidad en hombres adultos (Sheiner y cols., 2002), menor motilidad espermática en estudiantes de medicina (Eskiocak y cols., 2005), reducción de la apetencia sexual (Sato y cols., 1996), e impregnaciones de menos éxito (Lerman y cols., 1997).

### **7.2.9. Hormonas Neurohipofisarias: Oxitocina y Vasopresina**

Todas las hormonas neurohipofisarias son nonapéptidos con un puente disulfuro entre los residuos Cys 1 y 6. Basándose en el aminoácido en la posición 8, estos péptidos se clasifican en la vasopresina y las familias OT (oxitocina): la familia de la vasopresina contiene un aminoácido básico (Lys, Arg), y la familia OT contiene un aminoácido neutro en esta posición. Se originan en las células neurosecretoras de los núcleos paraventricular y supraóptico (SON) hipotalámicos

#### **a. Oxitocina**

El útero grávido es uno de los objetivos tradicionales de OT. La oxitocina es uno de los agentes uterotónicos más potentes y es clínicamente utilizado para inducir el parto. En el embarazo a término,

se observa un importante incremento en la densidad de receptores OT en el miometrio (x 200), que disminuyen rápidamente tras el parto (Fuchs y Fuchs, 1984). También se ha observado una alta concentración de receptores OT en la decidua al inicio del parto (x 5) (Takemura y cols., 1994). En el útero humano no gestante, los receptores OT, se expresan principalmente en las células del epitelio glandular endometrial, observándose los niveles más altos durante la ovulación., sin estar claro su papel fisiológico. (Takemura y cols., 1993). Se ha sugerido una síntesis paracrina de la oxitocina en los tejidos uterinos (Mitchell y cols., 1998). Los ovarios de varias especies animales contienen oxitocina, habiéndose sugerido una producción local (Ivell y Richter, 1984).

La oxitocina hipotalámica parece estar asociada con la eyaculación y con la modulación de la conducta sexual, habiéndose encontrado un sistema completo de OT en el testículo, epidídimo y próstata (Frayne y Nicholson, 1998). En el testículo, la oxitocina regula la contractilidad de los túbulos seminíferos, facilitando el transporte de los espermatozoides inmóviles al epidídimo y modula, de manera autocrina/paracrina, la esteroidogénesis al incrementar la actividad  $\alpha$ -reductasa testicular. (Nicholson y Jenkin, 1995). La oxitocina está presente en la próstata en concentraciones mayores que en el plasma sanguíneo, estando implicada en la contracción prostática y la expulsión de sus productos de secreción. Además, puede estimular el crecimiento de la próstata en ratones, por incremento de la actividad mitótica en el epitelio glandular (Plecas y cols., 1992). Se ha sugerido que la oxitocina actúa como un factor paracrino regulando el crecimiento celular a través de su actividad sobre la 5 $\alpha$  reductasa. (Nicholson, 1996).

Otra de las funciones clásicas asignadas a OT es la eyección de la leche de la glándula mamaria. La secreción de las glándulas mamarias se desencadena cuando el bebé comienza a chupar el pezón. La estimulación de los receptores táctiles en ese sitio genera impulsos sensoriales que se transmiten de los pezones a la médula espinal y luego a las neuronas secretoras oxitocinérgicas en el hipotálamo. La oxitocina es un componente decisivo para el inicio y mantenimiento de éxito la lactancia.

Además, la oxitocina es un agente natriurético no hipertensivo, al reducir la reabsorción de  $\text{Na}^{2+}$  (Conrad y cols., 1993), participando en el control de líquidos corporales y en la homeostasis cardiovascular (Gutkowska y cols., 1997). Interviene activamente en el programa de diferenciación de las células T, estimula la oxidación de la glucosa y la lipogénesis y el aumento de la actividad de la piruvato

deshidrogenada en los adipocitos (Hanif y cols., 1982) y disminuye la liberación y / o síntesis de cortisol en los seres humanos (Legros y cols., 1988). Por otro lado, modula el comportamiento sexual y social y tiene una potente acción antiestrés. Actúa como una hormona de saciedad y atenúa los procesos de aprendizaje y memoria. También inhibe el desarrollo de la tolerancia a la morfina y atenúa los síntomas de abstinencia a la morfina en ratones. (Laorden y cols., 1997). Se han encontrado niveles elevados de OT en el LCR en los trastornos obsesivos compulsivos, depresión, esquizofrenia y una disminución en los trastornos de la alimentación

## **b. Vasopresina**

La vasopresina actúa tanto como una hormona y como un neurotransmisor / neuromodulador. Como una hormona, sus órganos diana son el riñón, los vasos sanguíneos, el hígado, las plaquetas y la hipófisis anterior. Como un neurotransmisor / neuromodulador, la vasopresina desempeña un papel en las funciones autónomas, como la regulación cardiovascular y la regulación de la temperatura y está implicada en el complejo de las funciones conductuales y cognitivas, como el comportamiento sexual, la formación de pareja y el comportamiento social (Raggenbass, 2008).

Los efectos de la vasopresina están mediados por tres tipos de receptores:  $V_{1a}$ ,  $V_{1b}$  y  $V_2$  pertenecientes a la familia G-proteínas. Esta implicada en la regulación de la homeostasis de fluidos, metabolismo y secreción hormonal. Así, mantiene los niveles de ACTH y corticosterona en condiciones basales y de stress, aumenta la liberación de aldosterona e insulina; modula el metabolismo lipídico por su acción antilipolítica y regula el catabolismo proteico y la homeostasis glucémica (Tanoue, 2009).

## **8. AMINOPEPTIDASAS Y FERTILIDAD**

### **8.1 Regulación del ciclo sexual.**

Los orígenes de la presente investigación se remontan sin duda a los primeros trabajos que implicaron a los enzimas proteolíticos en la liberación hormonal del eje hipotalámico-hipofisario, y concretamente en la regulación del ciclo sexual femenino.

Los primeros trabajos que relacionan a las aminopeptidasas con las hormonas sexuales datan de final de la década de los 60. Uno de ellos fue realizado por Vanha-Perttula en 1969. En él se describe un incremento de actividad de Leu-aminopeptidasa en la hipófisis tras tratamientos con estrógenos. También se observaron incrementos en diversas actividades aminopeptidasicas tras administración de estrógenos y progestagenos en el hipotálamo de ratas de ambos sexos (Bickel y cols., 1972; Khul y cols., 1978).

Prácticamente al mismo tiempo, se propuso que la GNRH era inactivada por un enzima parecido a la oxitocinasa y por la Cys-aminopeptidasa, implicando esta actividad en los sistemas de retroalimentación de las gonadotropinas, debido a los cambios observados en la actividad aminopeptidasica hipofisaria, tras administración i.c.v. de LH. La estimulación de la actividad de Cys-aminopeptidasa parece ser distinta en el hipotálamo y en la hipófisis, ya que los esteroides sexuales parecen ser necesarios solo en el primer caso (Khul y cols., 1978).

Es importante indicar que la degradación de la GNRH no está limitada al eje hipotalámico-hipofisario, ya que en todas las zonas cerebrales existen los enzimas capaces de hidrolizar el decapeptido.

El ciclo sexual es uno de los acontecimientos en los que se producen alteraciones de los niveles hormonales; por ello, y debido a lo mencionado anteriormente, no es de extrañar que se produzcan alteraciones en las actividades de los enzimas proteolíticos a lo largo de él. En este sentido, se han encontrado variaciones de la actividad Cys-aminopeptidasa durante el ciclo estral de la rata, tanto en hipófisis como en hipotálamo. En el primero de los casos, los mayores niveles de actividad se producen en el metaestro (niveles bajos de gonadotropinas) y los menores en la tarde del proestro (momento en el que se produce el pico preovulatorio de la LH) (Khul y Taubert, 1975). Respecto al hipotálamo, los resultados son parecidos, coincidiendo niveles altos de actividad enzimática con niveles hormonales bajos y viceversa, si exceptuamos el proestro en el que se producen los mayores niveles de LH y GNRH. Y, sin embargo, los

niveles de actividad aminopeptidasica no son los más bajos (Khul y Taubert, 1975).

Con estos resultados, se sugirió que, a pesar de que la Cys-aminopeptidasa estaba involucrada en la secreción tónica de la GNRH. y en la sensibilidad de las gonadotropinas a los factores hipotalámicos, aparentemente no influía en el pico preovulatorio de la LH.

Posteriores estudios describieron variaciones de diversas actividades aminopeptidasicas durante el ciclo estral de la rata y su gestación, tanto a nivel cerebral como sérico.

Todas las actividades básicas y neutras ensayadas presentaron los mayores niveles en hipotálamo e hipófisis durante la fase de proestro y tras el parto, coincidiendo estas situaciones con los mayores niveles de secreción gonadotropina. (Gandarias y cols., 1993 a) Durante la tarde del proestro, también se apreciaron incrementos significativos en otras regiones cerebrales como la corteza y el sistema límbico. (Gandarias y cols., 1993 b, 1994c).

En cuanto a la actividad aminopeptidasica acida estudiada (asp-aminopeptidasa), no se obtuvieron modificaciones significativas durante el ciclo en ninguna de las regiones cerebrales ensayadas, por lo que no parece que este enzima tenga una influencia directa sobre la regulación de este acontecimiento fisiológico. (Gandarias y cols., 1993 c).

Debido a que estaba descrito que las encefalinas se encuentran involucradas en el control de la liberación cíclica hormonal (es necesario que se produzca un descenso en el tono opioide durante la fase preovulatoria -proestro- para que se produzca la liberación de gonadotropinas), se realizaron otros trabajos en los que se ensayaron actividades enzimáticas específicas degradadoras de encefalinas: La tyr-aminopeptidasa soluble y dos pertenecientes a la fracción unida a membrana, las aminopeptidasas M y MII. Los resultados obtenidos mostraron como la actividad soluble variaba a lo largo del ciclo, presentado mayores niveles de actividad durante la tarde del proestro a nivel hipotalámico (Fernández, 1996). Del mismo modo, se observó que la aminopeptidasa M variaba a lo largo del ciclo, presentando sus mayores niveles en la tarde del proestro a nivel de hipotálamo, hipófisis y amígdala (Gandarias y cols., 1996). Todos estos picos de actividad peptidasica son coincidentes con un descenso en el tono opioide, pudiendo por ello estar implicadas en la regulación de ciclo sexual.

Otro aspecto que parece corroborar lo anterior son los ensayos peptidasicos llevados a cabo tras orquidectomia y ovariectomia. Tras las intervenciones, se produce un incremento de actividad mayor en machos que en hembras, lo que coincide con una mayor elevación de los niveles de LH plasmáticos que se observan en los primeros tras la castración (Gandarias y cols., 1989).

Los estudios posteriores han implicado fundamentalmente a péptidos neuroactivos y no a las actividades proteolíticas reguladoras de los mismos.

## **8.2. Regulación de la fertilidad masculina**

Las enzimas proteolíticas poseen un papel importante en los sistemas biológicos in activando por hidrólisis una gran variedad de sustratos biológicamente activos. Algunas de estas peptidasas pueden intervenir en la función reproductora masculina regulando los niveles de péptidos biológicamente activos en los testículos (Chesneau y cols., 1996; Monsees y cols., 1998) y en el propio espermatozoide. (Valdivia y cols., 2004; Kondho y cols., 2005, Corvol y cols., 2005).

Los niveles de péptidos opioides están controlados por degradación enzimática, siendo sus enzimas reguladores los más estudiados hasta el momento. Específicamente, son dos las enzimas degradadoras de encefalinas: la APN y la NEP. Ambas enzimas presentan una actividad particularmente elevada en semen, siendo significativamente superior con respecto a actividades presentes en otros tejidos corporales (Fernández y cols., 2002). Sin embargo, actualmente no se conoce con exactitud la función principal de ambas enzimas en la fertilidad masculina.

En testículos de ratón, la APN se encuentra altamente expresada en las células de Sertoli y de Leydig, mientras que en las células germinales, no se ha detectado expresión génica (Osada y cols., 2001). Además, ratones deficientes en la APN, son in fértiles y presentan defectos en la espermatogénesis debido a que poseen alterada la función de las células de Sertoli (Osada y cols., 2001). Esto sugiere que la APN podría regular la función reproductora a nivel testicular.

En semen, la APN presenta una actividad particularmente elevada, siendo significativamente superior con respecto a actividades presentes en otros tejidos corporales. Además de en espermatozoides,

se ha detectado actividad de la APN en otras fracciones seminales (Fernández y cols., 2002). En plasma seminal, se ha purificado y caracterizado una forma soluble catalíticamente activa de la APN, a pesar de ser principalmente una enzima de membrana (Huang y cols., 1997; Fernández y cols., 2002). Además, se ha descrito la presencia de la APN con actividad catalítica en prostasoma humanos (Fernández y cols., 2002, Utleig y cols., 2003, Irazusta y cols., 2004) que puede transferirse desde los prostasomas a los espermatozoides tras producirse la fusión de sus membranas (Arienti y cols., 1997).

Actualmente, sin embargo, se desconoce cuál podría ser la función de la APN en espermatozoides. En estudios de espermatozoides de mejillón se observó que, la APN presente en los mismos, interacciona con moléculas de la membrana del ovocito y, a consecuencia de ello, se induce la reacción acrosómica (Togo y Morisawa, 2004; Togo y Morisawa, 1997) por lo que la APN podría estar implicadas en la reacción acrosómica.

Actividad de la NEP se ha localizado en distintas partes del aparato reproductor masculino de rata tales como el epidídimo, en la próstata y en los testículos (Erdös y cols., 1985). A pesar de no existir muchos estudios de la NEP en los testículos, se ha descrito la presencia de la NEP en las células de Sertoli, ya que hay actividad enzimática de la NEP en la fracción de membrana de dichas células, pudiendo degradar pequeños péptidos bioactivos como la met- y leu-encefalinas, bradiquininas y sustancia P (Monsees y cols., 1998). Se han descrito además, dos tipos de transcritos de la NEP en homogenados de testículos de rata que se transcriben en igual cantidad. (Li y cols., 1995), pero no hay estudios que determinen cual es su función en la reproducción.

Recientemente, sin embargo, se ha aislado y clonado un nuevo miembro de la familia de la NEP, la NEP2, que se expresa principalmente en testículos (Ikeda y cols., 1999). La NEP2 se expresa eficientemente en testículos tanto de rata como de ratón (Ouimet y cols., 2000; Ghaddar y cols., 2000). Mediante estudios de hibridación *in situ*, se localizó el mRNA de la NEP2 en los túbulos seminíferos, principalmente en espermátidas y en todas las células de la espermatogénesis (Ghaddar y cols., 2000). Además, investigaciones realizadas en ratones *knock out* para NEP2 relacionan dicha enzima en la fertilidad masculina. Estos ratones, a pesar de presentar una función testicular y espermática normal, tienen reducida su fertilidad, ya que muestran una menor eficiencia en la fertilización del ovocito y los



embriones resultantes presentan defectos en el desarrollo. (Carpentier y cols., 2004).

En semen, se ha descrito la presencia de la NEP catalíticamente activa en prostasomas (Carlsson y cols., 2006; Fernández y cols., 2002). En cuanto a las células espermáticas, algunos estudios muestran actividad de la NEP en espermatozoides de numerosas especies y la relacionan con la movilidad espermática (Boettger y cols., 1993; Díaz-Perez y Meizel, 1992; Heder y cols., 1994; Siems y col., 2003). Sin embargo, otros estudios, no corroboran la presencia de dicha actividad (Correa y cols., 2000; Fernández y cols., 2002), por lo que actualmente no se conoce con exactitud ni su presencia en espermatozoides, ni su implicación en la función espermática.

De hecho, un estudio más reciente demostró la presencia de APN en todas las fracciones seminales estudiadas (Irazusta y cols., 2004), tanto de personas fértiles como en muestras astenozoospermicas, mientras que la actividad NEP solo se presentaba en prostasomas, siendo estos resultados coincidentes con los de Arienti y cols. (1997). Esto permitió sugerir que la NEP podría originarse a nivel prostático, dado que estos orgánulos extracelulares tienen su origen precisamente a ese nivel (Ronquist y Brody, 1978).

Por otro lado, los niveles de actividad APN eran inferiores en muestras astenozoospermicas que en normozoospermicas, mientras que los niveles de NEP no mostraban diferencias entre los diferentes grupos ensayados.

Finalmente, en referencia al resto de los enzimas ensayados, comentar que estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación (no publicados), han mostrado que los mayores niveles de actividad aminopeptidasica en muestras normozoospermicas corresponden a la APN seguida de la DPPIV. No existen en este momento estudios que describan al resto de las aminopeptidasas en pacientes astenozoospermicos y, por tanto, no resulta posible su comparación con otros grupos.



## **II. OBJETIVOS**



En el año 2002, Fernández y cols., publicaron el primer trabajo que describía los niveles de actividad aminopeptidásica en diversas fracciones de semen humano normozoospermico. Los altos valores de actividad observados en las diferentes fracciones espermáticas estudiadas, sugirieron que tanto las peptidasas como sus sustratos naturales podrían estar implicados en la fisiología seminal, a través de la regulación de péptidos fisiológicamente activos tanto en testículos como en el propio espermatozoide.

Posteriormente, se fueron publicando varios trabajos en los que se describieron por un lado la regulación de la motilidad espermática mediada por la APN y la NEP mediante un mecanismo que implicaba al sistema opioide (Irazusta y cols, 2004), y por otro el propio papel de dicho sistema (regulado por proteasas) y de sus receptores a través de un efecto directo sobre los espermatozoides (Agirregoitia y cols., 2006).

En el año 2004 Yavas y Selub publicaron un trabajo epidemiológico en el que planteaban la relación directa que podía existir entre el tiempo transcurrido entre la obtención de la muestra de semen y la inseminación tras la capacitación seminal y las tasas de embarazo obtenidas. En dicho estudio concluyeron que retrasar el tratamiento del semen de 30 minutos hasta 1 hora y / o retrasar la IIU de 90 minutos hasta 2 horas después de la recolección compromete el resultado del embarazo en la ciclos de IIU, por lo que las muestras de semen deben ser tratados tan pronto como se pueda, después de la licuefacción y en los 30 minutos de la obtención, y la IIU debe realizarse tan pronto como se termine la preparación seminal (capacitación) y como máximo a los 90 minutos de la eyaculación. En su estudio, observaron un 48% de embarazos, si la muestra se procesaba dentro de los 30 minutos de la obtención, frente al 18% si la capacitación se iniciaba de 31-60 minutos después ( $p=0.02$ ). Así mismo las tasas de embarazo disminuían si el intervalo de tiempo desde la obtención hasta la inseminación era de 90 minutos (99%), 91-120minutos (22%) o  $> 120$  minutos (7%) ( $p<0.0001$ )

En base a estos resultados previos, los objetivos de la presente tesis doctoral se pueden desglosar en los siguientes apartados:

- 1) Describir distintos niveles de actividad proteolítica en semen humano astenozoospermico. La mayoría de los enzimas ensayados seria la primera vez que se presentan en este tipo de muestra seminal.

2) Comparar las actividades obtenidas en muestras astenozoospermicas con los resultados previos de semen normozoospermico, con el fin de describir las posibles diferencias existentes de dichos niveles en ambas formas seminales.

3) Observar la modificación enzimática obtenida a diferentes tiempos postcapacitación, con el fin de apreciar la posible alteración metabólica que pudiera producirse con el paso del tiempo.

4) Correlacionar estos niveles aminopeptidásicos con la tasa de fertilización obtenida. Los puntos anteriores podrían permitir la confirmación (en su caso) de los resultados obtenidos por Yavas y Selub.

5) Correlacionar los resultados de actividad aminopeptidásica obtenidos con diferentes parámetros clínicos de fertilidad, tales como tasa de embarazos, y su relación con el número de espermatozoides recuperados, morfología espermática, intervalo de tiempo entre la obtención de la muestra y la inseminación y entre la capacitación y la inseminación.



## **III. MATERIAL Y MÉTODOS**





## **1. SUJETOS DE ESTUDIO**

### **1.1 Inclusión**

Dadas las implicaciones éticas y relativas a los derechos de los pacientes de la presente investigación clínica, este proyecto ha sido presentado para su valoración al "Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC)" del Servicio Vasco de Salud / Osakidetza.

Los pacientes fueron seleccionados y diagnosticados (criterios OMS 1999) en los Laboratorio de Reproducción Asistida del Hospital de Cruces (Bizkaia). En este Centro también se realizó el seguimiento de la capacidad fertilizadora de las muestras.

Así mismo, todas las muestras se obtuvieron de pacientes voluntarios, a los que se presentó un formulario de consentimiento informado así como una hoja informativa sobre el estudio que iba a llevarse a cabo. Estos modelos los presentamos a continuación.

---

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

---

**ESTUDIO DE LA PÉRDIDA DE CAPACIDAD FERTILIZANTE DE LOS ESPERMATOZOIDES. INFLUENCIA DE PROTEINAS DE MEMBRANA.**

Yo.....

(Nombre y apellidos del participante)

\*He leído la hoja informativa que se me ha entregado

\*He recibido suficiente información sobre el estudio

\*He podido hacer preguntas sobre el estudio

He hablado con la Dra. Olga Ramón, investigadora principal del estudio.

Comprendo que mi participación es voluntaria y presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha.....

Fecha.....

Firma del paciente

Firma del médico.

---

CONFIDENCIAL

---

---

**HOJA INFORMATIVA**

---

Se le invita a participar en un estudio de investigación titulado "*Estudio de la pérdida de capacidad fertilizante de los espermatozoides. Influencia de proteínas de membrana*", bajo la dirección de la Dra. Olga Ramón, médico adjunto a la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital de Cruces y el Dr. Luíś Casis, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad del País Vasco/EHU.

El propósito de la presente hoja informativa es explicarle en qué consiste este estudio para que Vd. decida si desea o no participar en él. El médico le explicará cualquier cosa que no haya quedado clara y responderá a las preguntas que Vd. desee formularle. Si quiere tener más información o quiere matizar o profundizar en algún punto, pregunte sin ningún reparo.

**Información general:**

La estructura de la membrana de los espermatozoides juega un papel crucial en la fertilización exitosa, ya que tanto la reacción acrosómica como la fusión espermatozoide-oocito son eventos asociados a la membrana. En este estudio determinaremos la posible pérdida de capacidad fertilizante de los espermatozoides con el tiempo, tratando de correlacionarla con los niveles de actividad de diversos enzimas de membrana, si bien, también incluiremos en el estudio actividades solubles, determinando cómo afectan estos parámetros a las tasas de fertilización.

**Procedimientos:**

Si Vd. presta su consentimiento, los espermatozoides **sobrantes** de la muestra de semen serán objeto de una serie de análisis suplementarios (estudio de los niveles enzimáticos, tanto en plasma seminal como en espermatozoide).

Los espermatozoides que serán objeto del análisis específico, de no ser utilizados por este proyecto de investigación, serán automáticamente desechados. **Su empleo, por lo tanto, en ningún caso supone una disminución en las posibilidades de éxito de la fertilización**, y podrían tener en el futuro importantes aplicaciones clínicas.

Las mencionadas muestras seminales en ningún caso serán objeto de otros análisis/destinos diferentes del mencionado.

**Confidencialidad:**

Se garantiza la absoluta confidencialidad tanto de su historial clínico como de cualquier otro documento médico. El anonimato más absoluto será mantenido cuando se publiquen los resultados del estudio. El manejo y análisis de los datos se realizará teniendo en cuenta en todo momento la Ley orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal, evitando incluso tener que emplear sus iniciales y/o número de identificación en el estudio.

**Participación voluntaria:**

La participación en este estudio es totalmente voluntaria. Vd. puede negarse a participar en el estudio o retirarse del mismo en cualquier momento sin que ello suponga perjuicio alguno y sin afectar al tratamiento médico que Vd. reciba en el futuro.

## **1.2. Estimulación ovárica**

Todas las pacientes fueron estimuladas según nuestro protocolo habitual. Iniciamos la estimulación de ovulación con 100-150 UI/día de FSH recombinante (Gonal F®, Laboratorios Merck-Serono, España), desde el 2º día del ciclo menstrual, ajustando la dosis según la respuesta folicular evaluada mediante foliculometría transvaginal y estradiol plasmático. Administrando 0.25 mg./día de cetorelix (Cetrotide® Laboratorios Merck-Serono, España) con diámetros foliculares de 16 mm., manteniéndolo hasta el día de la administración de la rec-HCG, suplementando la estimulación FSH con LH recombinante (Luveris®, Laboratorios Merck-Serono, España) 75 UI/día desde el inicio del cetorelix, hasta el día de la rec-HCG

Administramos 250 mcg. de rec-HCG (Ovitrelle, Laboratorios Merck-Serono, España) cuando observamos al menos 3 folículos  $\geq$  de 18 mm., con un nivel de estradiol  $>$  de 600 pg./ml. Suspendemos el ciclo en presencia de  $< 3$  o  $> 5$  folículos. Realizamos una única inseminación por ciclo a las 37-39 horas post HCG efectuando 6 ciclos de inseminación por paciente, si no se consigue previamente el embarazo.

## **1.3. Preparación de las muestras seminales**

Las muestras seminales (n=50) son procesadas mediante la capacitación espermática. Esta técnica consiste en seleccionar los espermatozoides con mejor motilidad, a la vez que eliminamos el plasma seminal y los detritus.

### **1.3.1. Recogida de las muestras seminales**

La muestra de semen se recogerá, excepto en casos especiales, por masturbación, tras un período de abstinencia sexual no inferior a 2 días, ni superior a 7, en un frasco estéril, teniendo un especial cuidado en que no se derrame parte de la misma.

Las muestras se obtienen en el domicilio o en la Unidad de Reproducción cuando la distancia geográfica sea excesiva y condicione un intervalo de tiempo superior a una hora desde la obtención hasta la entrega. Antes del procesamiento la muestra se mantiene 20°C y 40°C hasta su total licuefacción y no debe pasar más de media hora desde su obtención hasta su procesamiento.

### **1.3.2. Evaluación de la muestra**

La evaluación de la muestra se realiza, colocando una gota de 10 microlitros de la misma bien homogeneizada y licuada sobre un portaobjetos calentado a 37°C. Valoraremos la concentración, los diferentes grados de motilidad y la morfología.

### **1.3.3. Preparación de la muestra**

Las dos Técnicas que utilizamos para la capacitación espermática en los laboratorios de Reproducción son el *swim-up* y los gradientes de densidad

#### **1.3.3.1. El Swim-up**

Es la técnica más sencilla a utilizar. Se basa en la separación de la población de espermatozoides móviles desde el sedimento formado tras la centrifugación, al medio de cultivo (Arny y Quagliarello, 1987). Permite una buena recuperación de espermatozoides móviles en muestras normozoospermicas, si bien no es tan eficaz en muestras oligo y/o astenozoospermicas.

Una vez licuado el semen, se mezcla con el medio de cultivo, en proporción 1/1, se homogeniza y se centrifuga a 600 g, durante 10 minutos. Se retira el sobrenadante, cuidando de no tocar el sedimento que esta formado por los espermatozoides y células seminales. A continuación se añade 0.5 ml de medio de cultivo, dejándolo resbalar por las paredes del tubo, con cuidado de no deshacer el sedimento. En el caso de muestras patológicas, se reduce el volumen (0.2-0.3 ml).

A continuación se coloca el tubo, con una inclinación de 45°, en la estufa de CO<sub>2</sub> a 37° durante una hora. En ese tiempo, los espermatozoides móviles que se encontraban en el sedimento nadan hacia la parte superior del sobrenadante, quedando en el sedimento los espermatozoides inmóviles junto con los restos celulares. Se recupera el sobrenadante, y se almacena en la estufa de CO<sub>2</sub> a 37°, hasta la inseminación

#### **1.3.3.2. Los Gradientes de Densidad**

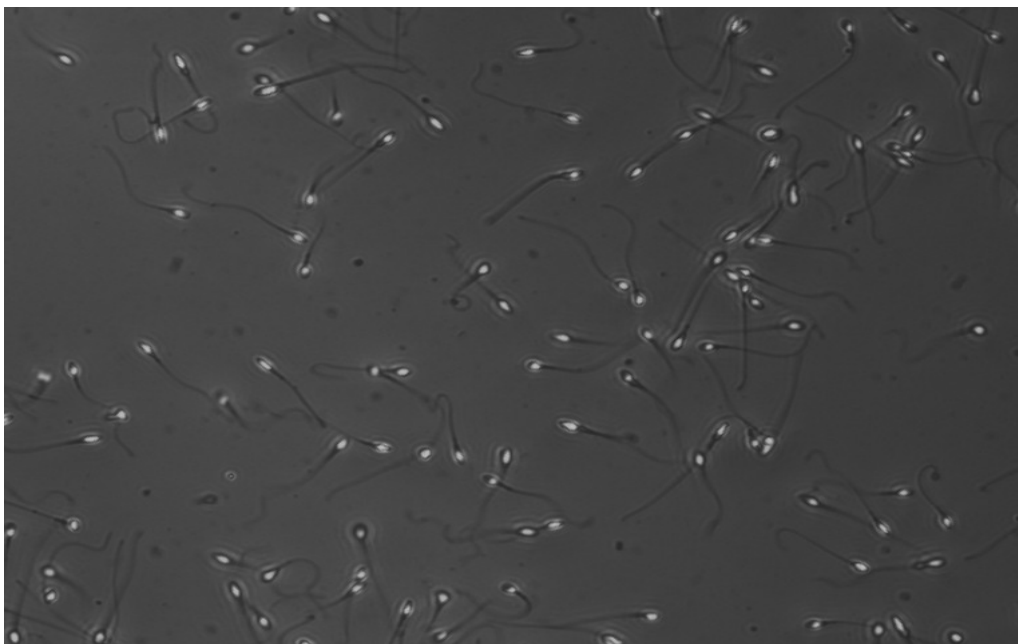
Es la técnica que empleamos habitualmente en nuestro programa de Inseminaciones Intrauterinas. Nos permite una mejor

recuperación de espermatozoides móviles, sobre todo en las muestras con baja concentración espermática ó de movilidad. El preparado que empleamos es SupraSperm® 100% (MediCult) y los gradientes de densidad de 90% y 45%.

Una vez licuada la muestra seminal depositamos 1cc de medio de gradiente al 90% en un tubo estéril, de fondo cónico y tapón de rosca. A continuación, y resbalando por las paredes del tubo, añadimos 1 cc de medio de gradiente al 45%. Teniendo especial cuidado en que no se mezclen los diferentes gradientes, y se rompa la interfase entre ellos. Y, por último, depositamos el semen, haciéndolo deslizar suavemente por la pared del tubo. Centrifugamos a 300 g durante 20 minutos y a continuación recogemos el sedimento (que se encuentra en el gradiente de mayor densidad) y lo pasamos a otro tubo con 5 ml. de medio de cultivo (IVF MediCult® Dinamarca) y centrifugamos a 300 g durante 10 minutos. Eliminamos el sobrenadante, y resuspendemos el pellet en un volumen de 0,4 ml. de medio de cultivo.

Los volúmenes que utilizamos, tanto de los gradientes, como del semen, dependerán de la concentración y motilidad de la muestra de semen. Pueden variar desde 0,5 hasta 1,5ml. Evaluamos la muestra recuperada, y la mantenemos a 37°C en el incubador de CO<sub>2</sub>, hasta el momento de la inseminación.

Todas las muestras procesadas tanto por la técnica de *swin-up*, como por centrifugación en gradientes, fueron observadas visualmente mediante un microscopio de contraste de fase para verificar la ausencia de otros tipos celulares (Figura 20).



**FIGURA 20.-** Imagen de contraste de fase de la pureza de la población espermática tras la técnica de *swim-up* o centrifugación en gradiente de densidad.

### **1.3.4 Análisis de la movilidad espermática**

La medición de la movilidad espermática se realizó mediante un análisis computerizado de la movilidad seminal utilizando el software del SCA® (Sperm Class Analyzer, V5.1), configurado con los parámetros de la tabla 9 y asociado a un microscopio de contraste de fase. La concentración y la movilidad espermática se determinaron añadiendo alícuotas de 5  $\mu$ l de las diferentes muestras en una cámara de recuento tipo Makler, precalentada a 37 °C, específica de espermatozoides. Se contaron un mínimo de 200 espermatozoides por cada gota analizada.



**Tabla 2.-** Configuración de los valores de análisis usados en el sistema CASA

|                                    |   |                       |
|------------------------------------|---|-----------------------|
| <b>Área de partícula analizada</b> |   | 2-60 $\mu\text{m}$    |
| <b>LVV</b>                         | Velocidad mínima y máxima para que un espermatozoide sea considerado lento. Espermatozoides con valores inferiores al LVV mínimo serán considerados inmóviles   | 10>15 $\mu\text{m/s}$ |
| <b>MVV</b>                         | Velocidad mínima y máxima para que un espermatozoide sea considerado medio. Espermatozoides con velocidades superiores al MVV máximo serán considerados rápidos | 15>35 $\mu\text{m/s}$ |
| <b>Mínimo SRT</b>                  | Valor de STR a partir del cual un espermatozoide es considerado progresivo  | 80%                   |

**Tabla 3.-** Clasificación de los espermatozoides según los parámetros de la OMS 1999

| <b>Clasificación de espermatozoides</b>                                       | <b>Velocidad</b>      |
|---|-----------------------|
| <b>Movilidad tipo a.</b> Espermatozoides rápidos progresivos                  | >25 $\mu\text{m/s}$   |
| <b>Movilidad tipo b.</b> Espermatozoides lentos y/o zigzagueantes progresivos | 10-25 $\mu\text{m/s}$ |
| <b>Movilidad tipo c.</b> Espermatozoides no progresivos                       | <10 $\mu\text{m/s}$   |
| <b>Movilidad tipo d.</b> Espermatozoides inmóviles                            |                       |

La valoración de la movilidad de los espermatozoides se realizó según las recomendaciones de la OMS (OMS 1999), clasificando los espermatozoides en base a su velocidad (Tabla 1 y 2). Además, en función de la velocidad, el sistema CASA (computer-assisted semen análisis) analizó los siguientes parámetros cinéticos de movilidad (Tabla 3) (Figura 21).

| <b>Parámetros cinéticos de movilidad espermática</b> |  | <b>Unidad</b>   |
|--|--|-----------------|
| <b>VCL</b>   | Velocidad curvilínea. Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo.   | $\mu\text{m/s}$ |
| <b>VSL</b>   | Velocidad rectilínea. Distancia recorrida por el espermatozoide desde el primer punto y el último de su trayectoria en función del tiempo.                                   | $\mu\text{m/s}$ |
| <b>VAP</b>   | Velocidad promedio. Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media en función del tiempo.  | $\mu\text{m/s}$ |
| <b>LIN</b>   | Índice de linealidad. Linealidad de la trayectoria curvilínea. $\text{VSL/VCL} \times 100$ .   | %               |
| <b>STR</b>   | Índice de rectitud. Rectitud de la trayectoria. $\text{VSL/VAP} \times 100$ .  | %               |
| <b>WOB</b>   | Índice de oscilación. Oscilación de la trayectoria real con respecto a la trayectoria promedio. $\text{VAP/VCL} \times 100$ .  | %               |
| <b>ALH</b>   | Amplitud promedio del desplazamiento lateral de la cabeza. Es la magnitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide con respecto a su trayectoria promedio. | $\mu\text{m}$   |
| <b>BCF</b>   | Frecuencia de la batida de la cabeza. Frecuencia con la cual la trayectoria curvilínea atraviesa la lineal en función del tiempo.  | Hz.             |

**Tabla 4.-** Parámetros cinéticos de la movilidad espermática determinados por el sistema CASA

#### **1.4. Inseminación Intrauterina**

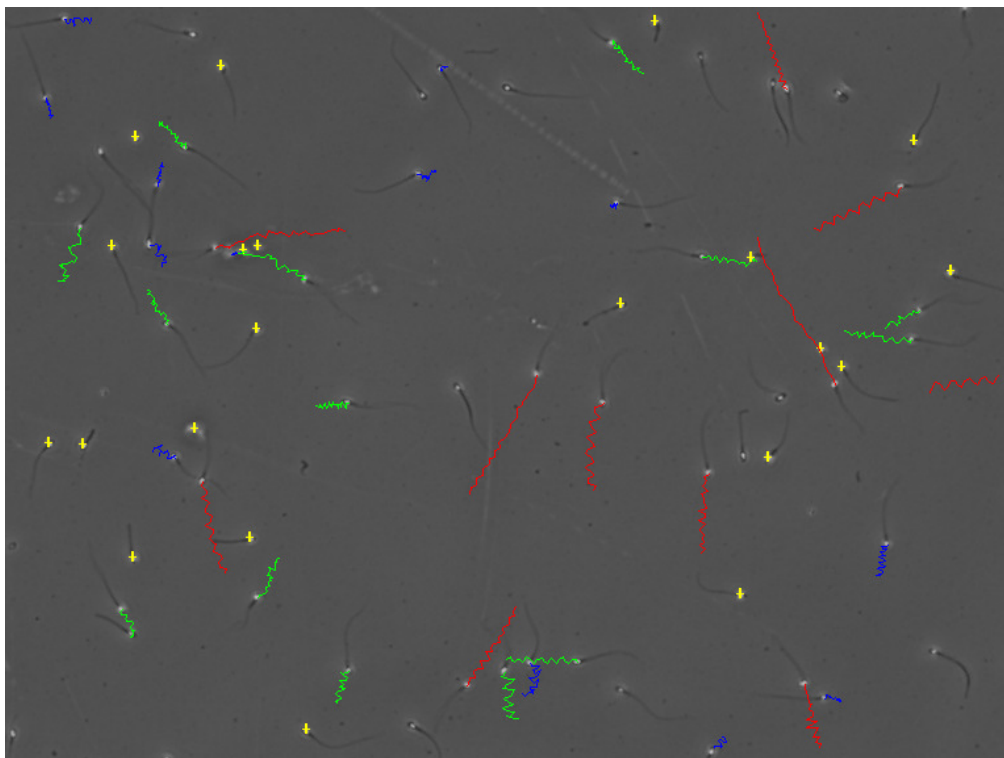
A las 38-40 h. de desencadenar la ovulación, depositamos la muestra espermática en el interior de la cavidad uterina, de forma cuidadosa para evitar traumatismos endometriales, mediante catéteres diseñados específicamente

#### **1.5. Fase lutea**

La fase lútea es suplementada con Progesterona micronizada vaginal (Utrogestan®, Laboratorios Besins-Iscovesco, París, Francia) a dosis de 200 mg cada 12 Horas. (9-11), durante 15 días.

#### **1.6. Definición de embarazo**

El embarazo se definirá como la existencia de un saco gestacional visible por ecografía transvaginal a las 5-6 semanas.



**Figura 21:** Análisis computerizado de la movilidad seminal. Imagen del microscopio de contraste de fase de la movilidad espermática medido a través del software Sperm Class Analyzer 2005<sup>®</sup>. Espermatozoides tipo a: trayectoria roja, espermatozoide tipo b: trayectoria verde, espermatozoide tipo c: trayectoria azul, espermatozoides tipo d: amarillos.

## 2. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Equipamiento

- Espectrofotómetro. UV-2401 PC. Shimadzu
- Espectrofluorofotómetro. RF-540. Shimadzu
- Ultracentrifugadora. Centrikon T2190. Kontron
- Rotor de ángulo fijo. TFT 45.6. Kontron
- Centrifugadora. Labofuge 200. Heraeus
- Balanza de precisión. R180D. Sartorius.
- Homogenizador. PZR 50 Heidolph.
- Juego de puntas de teflón. Selecta.
- Agitador Magnético por mosca termostatizado. Agimatic-s. Selecta.
- pH- metro GLP 21. Crison
- Pipetas automáticas de precisión. Nychiryo.

- Dispensador universal. MuLtipette plus. Eppendorf
- Ultracongelador -70°C

### 2.1.2. Reactivos

- Acetato sódico tri-hidratado. Merck
- Ácido clorhídrico 35% Panreac
- Ácido acético glacial. Probus S.A
- Ácido ortofosfórico 85%. Merck
- Albúmina bovina. Sigma-Aldrich
- Captopril. Sigma-Aldrich
- Cloruro de manganeso. Merck
- Cloruro sódico. Merck
- Dimethyl-sulfóxido (DMSO). Sigma-Aldrich
- DL-Dithiothreitol (DTT). Sigma-Aldrich
- EDTA. Merck
- Etanol absoluto. Probus S.A
- Fosfato sódico monobásico. Merck
- Fosfato sódico dibásico. Merck
- Puromicina. Sigma-Aldrich
- Tris (hidroximetil) aminometazol ( Trizma base). Sigma-Aldrich
- Azul brillante de Coomasie G-250. Sigma-Aldrich
- Z-Gly-Pro-  $\beta$ -naftilamina. Fluka
- L- Arg-  $\beta$ -naftilamida. Sigma-Aldrich
- L-Ala-  $\beta$ -naftilamida. Sigma-Aldrich
- L-Asp-AP-  $\beta$ -naftilamida . Sigma-Aldrich, H- Bachem
- N-Dansyl-D-Ala-Gly-pNO<sub>2</sub>-Phe-Gly. Sigma-Aldrich
- H- Gly-Pro- $\beta$ -naftilamida. Bachem
- L- ácido piroglutámico-  $\beta$ -naftilamida. Sigma-Aldrich

### 2.1.3. Soluciones

#### 2.1.3.1. Soluciones Tampón

##### Tris-HCl 0,2 M

Trizma base 24,22 gr + 1000 ml de agua destilada (pH 7,4 utilizando HCl 1N)

##### Tampón Fosfato 0,1 M.

Solución A 19 mL + Solución B 81mL + Agua destilada hasta 200 ml (pH 7.4)

·Solución A: Fosfato sódico monobásico 0,2M 27,6 gr.+ Agua destilada hasta 1000 mL

·Solución B: Fosfato sódico dibásico 0,2 M 28,4 gr.+ Agua destilada hasta 1000 mL

### **Tampón Acetato 0,1 M,**

Solución A 36,8 mL+ Solución B 13,2 mL+ Agua destilada hasta 200 mL (pH 4.2)

·Solución A: Ácido acético glacial 0,2 M 11,55 mL+ Agua destilada hasta 1000 mL

·Solución B: Acetato sódico tri-hidratado+ Acetato sódico tri-hidratado 27,22 gr.

+ Agua destilada hasta 1000 mL

### **Tampón Tris- HCl 1M,**

Trizma base X gr.+ Agua destilada hasta 1000 mL (pH 7,4 utilizando HCl 1N)

## **2.1.3.2. Soluciones para las muestras**

### **Universal IVF Médium (Origio Medicult Media)**

Solución de albúmina humana (HAS) + Insulina humana recombinante + Penicilina (50.000 UI/l + Estrptomina (50 mg/l)

### **SupraSperm® 100 (Origio Medicult Media)**

Cloruro calcico + Glucosa + HEPES +Solucion de albumina humana + Agua Milli RX + Sulfato de Magnesio + Cloruro Potásico + Fosfato potásico monobásico + Bicarbonato Sódico + Cloruro Sódico + Lactato Sódico + Piruvato sódico

## **2.1.3.3. Sustratos enzimaticos**

### **Sustrato proliil endopeptidasa**

Z-Gly-Pro-  $\beta$ -naftilamina 0,125 M + DTT 2 mM + BSA 10 mg/100 mL + Tampón fosfato 50 mM

### **Sustrato piroglutamil**

pGlu-  $\beta$  -naftilamida 0,125 mM + DTT 2 mM + EDTA 2 mM + BSA 10 mg/100 mL + Tampón fosfato 50 mM

**Sustrato aminopeptidasa básica**

Arg-  $\beta$ -naftilamida 0,125 mM + NaCl X mM + BSA 10 mg/100 mL + Tampón fosfato 50 mM

**Sustrato aminopeptidasa neutra**

Ala-  $\beta$ -naftilamida 0,125 mM + DTT 2 mM + BSA 10 mg/100 mL + Tampón fosfato 50 mM

**Sustrato aspartil-aminopeptidasa**

Asp-  $\beta$ -naftilamida 0,125 mM +  $\text{MnCl}_2$  X mM + BSA 10 mg/100 mL + Tampón Tris-HCl 50 mM

**Sustrato endopeptidasa neutra**

N-Dansyl-D-Ala-Gly-pNO<sub>2</sub>-Phe-Gly 0,125 mM + BSA 10 mg/100 mL + Tampón Tris-HCl 50 mM

**Sustrato dipeptidil peptidasa IV**

H- Gly-Pro- $\beta$ -naftilamida 0,125 mM + BSA 10 mg/100 mL + Tampón Tris-HCl 50 mM

**2.1.3.4. Soluciones para la determinación de la concentración de proteínas****Reactivo de Bradford**

Azul brillante Coomassie 0,117 mM, etanol al 5% (v/v), Ácido ortofosfórico al 15%.  
Filtrar dos veces.

**2.1.3.5. Soluciones para la RT-PCR****Tampón Tris/acetato/EDTA (TAE) T.A.E 50x, pH 7,4**

Trizma-base 121 gr., Ácido acético 28,55 mL, EDTA (Na<sub>2</sub>) 18.6 gr., H<sub>2</sub>O hasta 500 ml

**Gel de Agarosa**

500 mg de Agarosa, 49 mL H<sub>2</sub>O destilada, 1ml T.A.E

### **2.1.3.6. Otros**

#### **Albúmina**

**Etanol al 70%:** Etanol 35 mL, H<sub>2</sub>O libre de ARNasas 15 mL

#### **Sample buffer**

#### **MgCl<sub>2</sub> 1M**

#### **Peróxido de hidrógeno**

## **3.- Análisis de la actividad por ensayos enzimáticos**

### **3.1. Preparación de la muestra**

Inicialmente, tras la correspondiente capacitación, los tejidos (espermatozoides) fueron homogeneizados en tampón Tris-HCl 0.2 M (pH 7,4). El homogeneizado fue posteriormente centrifugado a 10.000 G durante 35 minutos a 4 °C. A continuación se retiró el sobrenadante (fracción Soluble), que fue la muestra utilizada para la determinación de las actividades enzimáticas específicas. Posteriormente se realizó la cuantificación de proteína con el método Bradford (Bradford et al., 1976).

Tras su adecuado procesamiento, las muestras se sometieron a los ensayos enzimáticos, todos basados en técnicas espectrofluorométricas, para la determinación de las actividades peptidásicas seleccionadas:

1.- Para ensayar las actividades APN, DPPIV, APA, APB, Asp-AP, PEP y PGI se usaron sustratos del tipo peptidil- o aminoacil-beta-naftilamida. Concretamente, los sustratos utilizados fueron Ala-β-naftilamida; H-Gly-Pro-β-naftilamida; H-Glu- β -naftilamida o Asp-AP-β-naftilamida; Arg-β-naftilamida; Asp-AP-β-naftilamida, Z-Gly-Pro- β-naftilamina y ácido piroglutámico- β-naftilamida. respectivamente.

2.- Para la determinación de la NEP se empleó un ensayo fluorométrico también, pero en este caso el sustrato fue el N-Dansyl-D-Ala-Gly-pNO<sub>2</sub>-Phe-Gly (DAGNPG).

### **3.2. Determinación de la actividad de las aminopeptidasas**

La concentración de un enzima en un tejido o líquido, puede determinarse midiendo la velocidad de una reacción catalizada por el enzima en cuestión. Para ello, puede medirse la disminución en la concentración de sustrato en el tiempo o el incremento que con el tiempo se produce en algunos de los productos de reacción.

Los sustratos artificiales más usados para la determinación de aminopeptidasas han sido, sin lugar a dudas, los derivados amídicos de la 2-naftilamina: las aminoacil-2-naftilamidas. Estos sustratos fueron introducidos por primera vez por Gomori (1954) y, desde entonces, se han obtenido derivados de todos los aminoácidos, de muchos dipéptidos e, incluso, de compuestos que han permitido la detección de diversas endopeptidasas.

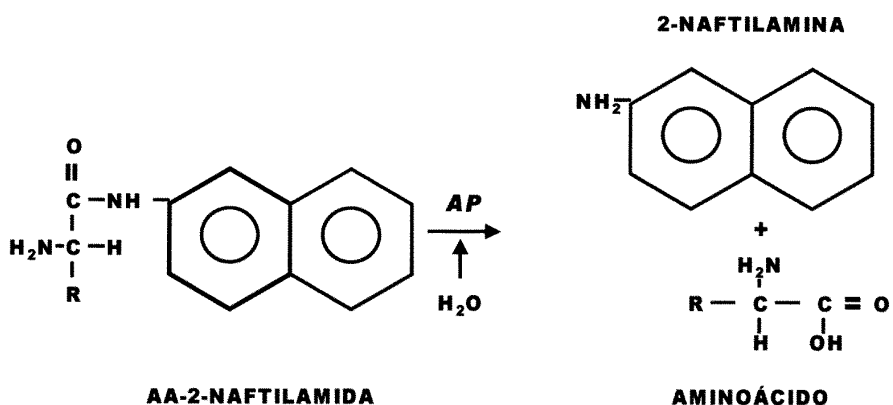
En principio, la 2-naftilamina liberada por acción enzimática, se acoplaba a una diazosal para producir color rojo o azul (dependiendo de la sal de acoplamiento considerada) y se medía espectrofotométricamente a 520 nm. Este método se ha aplicado también a la determinación histoquímica de aminopeptidasas (Gomori, 1954). Pero la 2-naftilamina liberada puede medirse fluorimétricamente, sin necesidad del posterior acoplamiento, siendo este método desarrollado por Greenberg en 1962, posteriormente modificado por Alba y cols. en 1989 y, en algunos casos, por nuestro propio equipo de investigación (Fernández y cols., 2002).

#### **3.2.1. Fundamento general**

Se incubaba el sustrato artificial junto con la muestra seminal. La presencia de aminopeptidasas en la muestra hará que la aminoacil-2-naftilamida se rompa liberando aminoácidos libres y moléculas de 2-naftilamina (figura 14). Esta molécula tiene la particularidad (que no tienen sus derivados amídicos) de ser fluorescente, y cuando es excitada con luz de 345 nm emite parte de esa energía a una longitud de onda de 412 nm. Esta propiedad permite que la cantidad de 2-naftilamina liberada pueda ser medida muy fácilmente mediante un espectrofluorímetro. La cantidad de 2-naftilamina liberada es controlada por la concentración del enzima en la muestra, de manera que la medida de 2-naftilamina puede ser extrapolada a concentración aminopeptidásica de la muestra. (Figura 22)



En concreto, los valores obtenidos en el fluorímetro son transformados en picomoles de beta-naftilamina liberada, mediante una ecuación obtenida tras la determinación de concentraciones decrecientes de 2-naftilamina, en un medio de solución igual al del sustrato utilizado.



**FIGURA 22.-** Esquema de la hidrólisis del sustrato de peptidasa en el ensayo enzimático. Uno de los productos obtenidos,  $\beta$ -naftilamina, emite fluorescencia a 412 nm cuando es excitado a 345 nm.

### 3.2.2. Fundamento particular para cada enzima.

En particular, se determinaron las actividades enzimáticas del pool de peptidasas en las fracciones celulares solubles de las muestras astenozoospermicas. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, empleándose como resultado final la media de las mismas.

Las muestras seminales (10 ul) se incubaron a la temperatura fisiológica (37°C) junto con 1 ml del sustrato artificial fluorogénico (Ala- $\beta$ -naftilamida; H-Gly-Pro- $\beta$ -naftilamida; H-Glu- $\beta$ -naftilamida o Asp-AP- $\beta$ -naftilamida; Arg- $\beta$ -naftilamida; Asp-AP- $\beta$ -naftilamida, Z-Gly-Pro- $\beta$ -naftilamina y ácido piroglutamico- $\beta$ -naftilamida). La presencia de aminopeptidasas en la muestra hizo, como hemos comentado, que la aminoacil-beta-naftilamida se rompiera liberando aminoácidos libres y moléculas de beta-naftilamina.

Esta última molécula tiene la particularidad, que no tienen sus derivados amídicos, de ser fluorescente. Así cuando es excitada con una luz de 435 nm emite parte de esta energía en una longitud de onda de 412 nm. Dicha propiedad permite que la cantidad de beta-naftilamina liberada pueda ser medida muy fácilmente mediante un espectrofluorímetro. La cantidad de producto fluorescente liberado está en función de la concentración del enzima en la muestra, de manera que la cantidad de beta-naftilamina medida puede ser extrapolada a concentración aminopeptidásica en el tejido estudiado.

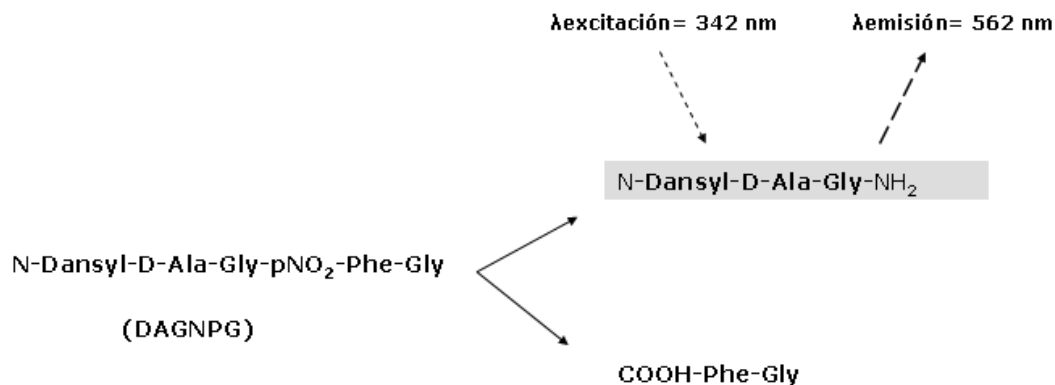
La NEP es una peptidasa unida a membrana que degrada encefalinas por ruptura del enlace Gly<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>. Un método para determinar su actividad es el método fluorimétrico, basado en la utilización del sustrato artificial fluorogénico DAGNPG: N-Dansyl-D-Ala-Gly-(p-Nitro)-Phe-Gly.

En este caso, 10 ul de tejido fueron incubados con 1 ml de sustrato. La presencia de NEP en la muestra provoca la ruptura del enlace nitro-fenil, Gly-(pNO<sub>2</sub>)Phe, en la secuencia peptídica (figura 15).

En el DAGNPG, la fluorescencia nativa del grupo Dansil está apantallada por la proximidad espacial del grupo (pNO<sub>2</sub>)Phe. De esta manera, cuando el péptido N-Dansyl-D-Ala-Gly (DAG) es liberado por la acción enzimática se produce un aumento de la fluorescencia que puede ser detectada y cuantificada a longitudes de onda de excitación y de emisión de 342 y 562 nm, respectivamente. Dicha propiedad permite que el dansil liberado pueda ser medido muy fácilmente mediante un espectrofluorímetro. La cantidad de producto fluorescente liberado está controlada por la concentración del enzima en la muestra, de manera que el DAG detectado fluorimétricamente puede ser extrapolado a concentración endopeptidasa neutra en el tejido estudiado.

### **3.2.3. Análisis de datos de las actividades peptidásicas**

Los valores obtenidos espectrofluorimétricamente o fotométricamente fueron transformados en picomoles de metabolito liberado mediante extrapolación, por ajuste no lineal, de los datos a una ecuación de regresión calculada a partir de una curva patrón. Posteriormente, estos datos fueron convertidos en unidades de actividad peptidasa (UP), definiéndose dicha unidad como la cantidad de enzima que hidroliza un picomol de sustrato por minuto. Los resultados finales se expresaron como actividad específica (unidades de actividad peptidásica/miligramo de proteína en la muestra).



**FIGURA 23.-** Esquema de la hidrólisis del sustrato de NEP en el ensayo enzimático. Uno de los productos obtenidos, Dansyl-D-Ala-Gly, emite fluorescencia a 562 nm cuando es excitado a 342 nm.

Los datos resultantes fueron analizados mediante el test (t) de Student para la comparación de muestras seminales. El mismo test fue empleado para la comparativa entre grados de las muestras. Para la comparación entre grupos, se empleó el test ANOVA para muestras no apareadas. Se llevó a cabo con el programa SPSS 12.0. Para la realización de los gráficos y la corroboración de los resultados estadísticos utilizamos el programa Prism de Graph Pad.

### 3.2.4. Técnica para la cuantificación de proteínas

El método está basado en la afinidad de los polipéptidos por un colorante, el Azul de Coomassie G-250 (Bradford y cols., 1976). La unión del colorante a las proteínas produce un cambio en la longitud de onda de máxima absorción del citado compuesto que pasa de 465 nm a 595 nm. El incremento de absorción, siempre y cuando exista un exceso de colorante, es directamente proporcional a la cantidad de proteína, por lo que este es el parámetro que se mide, en un espectrofotómetro y a 595 nm.

Se añadieron 2 ml del reactivo de Bradford a 10  $\mu$ l de muestra, a continuación se leyó la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro.

Dicho valor se determino frente a un blanco de reactivo (2 ml de reactivo de Bradford sin muestra).

El resultado de la medición se transformó en miligramos de proteína por mililitro, utilizando para ello una curva de calibración ( $y = ax + b$ ) obtenida tras medir por el mismo procedimiento, concentraciones crecientes de y conocidas de una solución estándar de albúmina bovina.

La extrapolación se llevó acabo en una hoja Excel de Office.

## **III. RESULTADOS**



## 1. Resultados Clínicos

Realizamos el estudio enzimático en muestras seminales provenientes de 50 ciclos aleatorios, correspondientes a 50 parejas distintas, en tratamiento mediante Inseminación Intrauterina, obteniendo 14 embarazos. La tasa de embarazo fue del 28 % /ciclo.

El protocolo de estimulación fue el mismo en todas las pacientes: Gonadotropinas recombinantes, con supresión hipofisaria mediante antagonistas GnRH y desencadenamiento de la ovulación con HCG recombinante, en presencia de al menos tres folículos > 16 mm.

La edad media de las mujeres fue de  $34.78 \pm 3.04$  años y la de los varones  $36.49 \pm 3.74$  años, con una duración de la esterilidad de  $32.48 \pm 11.87$  meses. (Tabla 5) La función ovárica estaba conservada en todas las pacientes, con una FSH basal de  $7.70 \pm 2.64$  mUI/ml y un estradiol basal de  $47.37 \pm 26.34$  pg/ml. (Tabla 7) El recuento de espermatozoides móviles (a+b) inseminados tras la capacitación (REM) fue de  $10.22 \pm 2.93$  millones, con una morfología normal del  $12.87\% \pm 4.12$  (Tabla 6).

El nº de folículos reclutados fue de  $4.38 \pm 1.04$  y los niveles de estradiol el día de la administración de la HCG fue de  $1206.8 \pm 591.9$  pg/ml. Los niveles de LH y progesterona el día de la administración de HCG fueron de  $3.66 \pm 3.24$  mUI/ml y  $0.72 \pm 0.53$  ng/ml, respectivamente (Tabla 8).

El intervalo medio de tiempo entre la obtención de la muestra seminal y la realización de la Inseminación Intrauterina fue de  $142 \pm 40$  minutos y entre el final de la capacitación y la Inseminación fue de  $25 \pm 17$  minutos. En todas las muestras, la capacitación se inicio tras completar el proceso de licuefacción. La obtención de la muestra seminal se realizo en casa o en la clínica, y el tiempo de entrega al laboratorio no supero una hora (Tabla 9).

Cuando agrupamos los ciclos en embarazos y no embarazos, no encontramos diferencias significativas en la edad de la mujer (34 vs. 35.08), edad del varón (36 vs. 36.6), porcentaje de esterilidad primaria (86% vs. 73%), ni porcentaje de esterilidad secundaria (14% vs. 27%). Sin embargo, la duración de la esterilidad fue significativamente menor en el grupo de no embarazadas (29.75 vs. 39.50 meses) (Tabla 5).

Tampoco encontramos diferencias significativas entre el grupo de embarazadas y no embarazadas cuando comparamos la función

ovárica, ni los parámetros seminales: FSH basal 7.3 vs. 7.85 mU/ml; Estradiol basal 39.3 vs. 50.05 pg/ml; REM 10.22 vs. 10.42 millones; Morfología normal 11.64 vs. 13.39% (Tablas 6 y 7).

**Tabla 5.-** Datos epidemiológicos

|                               | <b>Global</b> | <b>Embarazos</b> | <b>No embarazos</b> | <b>p</b> |
|-------------------------------|---------------|------------------|---------------------|----------|
| <b>Casos</b>                  | 50            | 14               | 14                  |          |
| <b>Edad mujer</b>             | 34.7±3.04     | 34±1.88          | 34±1.88             | ns       |
| <b>Edad varón</b>             | 36.49±3.74    | 36±4.23          | 36±4.23             | ns       |
| <b>Duración (meses)</b>       | 32.48±11.87   | 39.50±13.61      | 39.50±13.61         | <0.05    |
| <b>Esterilidad primaria</b>   | 76%           | 86%              | 86%                 | ns       |
| <b>Esterilidad secundaria</b> | 24%           | 14%              | 14%                 | ns       |

**Tabla 6.-** Parámetros seminales

|                       | <b>Global</b> | <b>Embarazo</b> | <b>No embarazo</b> | <b>p</b> |
|-----------------------|---------------|-----------------|--------------------|----------|
| <b>Casos</b>          | 50            | 14              | 36                 |          |
| <b>Morfología (%)</b> | 12.87±4.12    | 11.64±3.54      | 13.39±4.19         | ns       |
| <b>REM (millones)</b> | 10.22±2.93    | 10.22±2.93      | 10.42±3.10         | ns       |

**Tabla 7.-** Función ovárica

|                                | <b>Global</b> | <b>Embarazos</b> | <b>No embarazos</b> | <b>p</b> |
|--------------------------------|---------------|------------------|---------------------|----------|
| <b>Casos</b>                   | 50            | 14               | 36                  |          |
| <b>FSH basal (mU/ml)</b>       | 7.70±2.64     | 7.33±1.79        | 7.85±2.88           | ns       |
| <b>Estradiol basal (pg/ml)</b> | 47.37±26.34   | 39.33±17.09      | 50.05±27.87         | ns       |

La respuesta ovárica a la estimulación folicular fue similar entre el grupo de embarazos y no embarazos en número de folículos (4.57 vs. 4.30), niveles de estradiol (1123.1 vs. 1240.3 pg/ml) y niveles de LH (2.81 vs. 3.99 mUI/ml) el día de la administración de HCG, encontrando una diferencia significativa en los valores de progesterona plasmática (0.44 vs. 0.83) (Tabla 8).



El estudio de los tiempos en las diferentes fases del procesamiento seminal, demostró una diferencia significativa entre los grupos de embarazadas y no embarazadas en el intervalo medio de tiempo entre la obtención y la capacitación (61 vs. 76 minutos) pero no entre la obtención y la IAC (134 vs. 145 minutos) ni entre la finalización de la capacitación y la IAC (27 vs. 24 minutos) (Tabla 9).

**Tabla 8.-** Ciclo de estimulación

|                                  | <b>Global</b> | <b>Embarazo</b> | <b>No embarazo</b> | <b>p</b> |
|----------------------------------|---------------|-----------------|--------------------|----------|
| <b>Casos</b>                     | 50            | 14              | 36                 |          |
| <b>Folículos (n°)</b>            | 4.38±1.04     | 4.57±1.01       | 4.30±1.06          | ns       |
| <b>Estradiol día HCG (pg/ml)</b> | 1206.8±591.97 | 1123.1±483.26   | 1204.3±621.58      | ns       |
| <b>LH día HCG (mUI/ml)</b>       | 3.66±3.24     | 2.81±2.40       | 3.99±3.45          | ns       |
| <b>PP día HCG (ng/ml)</b>        | 0.72±0.53     | 0.44±0.18       | 0.83±0.59          | <0.05    |

**Tabla 9.-** Intervalos de tiempo

|  | <b>Global</b> | <b>Embarazo</b> | <b>No embarazo</b> | <b>p</b> |
|--|---------------|-----------------|--------------------|----------|
| <b>Casos</b>                               | 50            | 14              | 36                 |          |
| <b>Obtención/Capacitación (minutos)</b>    | 72±22.9       | 61.4±26.3       | 76.1±20.7          | <0.05    |
| <b>Capacitación/Inseminación (minutos)</b> | 25.3±13.7     | 27.8±13.2       | 24.3±14.2          | ns       |
| <b>Obtención/Inseminación (minutos)</b>    | 142.4±24.7    | 134.2±23.8      | 145.5±24.77        | ns       |

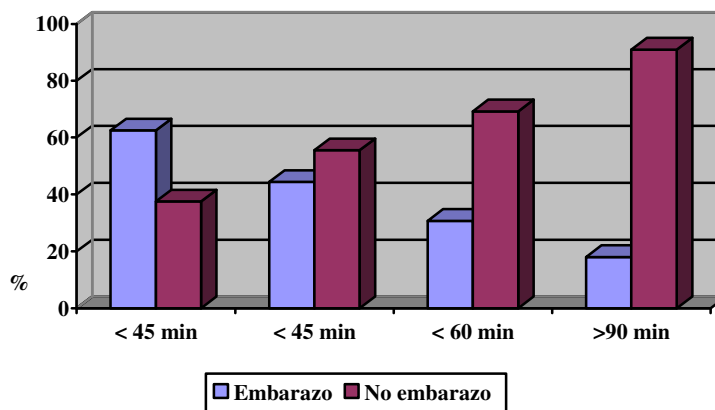
Al agrupar los resultados en intervalos de tiempo, observamos que:

La tasa de embarazo disminuía, según aumentaba el tiempo transcurrido desde la obtención y la preparación seminal (<45 min. (62.5%), <60 min. (44.4%), <90 min. (33.3%) y > 90 min. (16%),) (Tabla 10).

Entre la obtención y la Inseminación, no encontramos diferencias significativas para las tasas de embarazo/ciclo, en los intervalos de tiempo <120 min., 121-150 min., y >150 min. Sin embargo cuando el tiempo invertido fue superior a 150 minutos la tasa

de embarazo/ciclo se redujo a la tercera parte (11% vs. 35%) (Tabla 11).

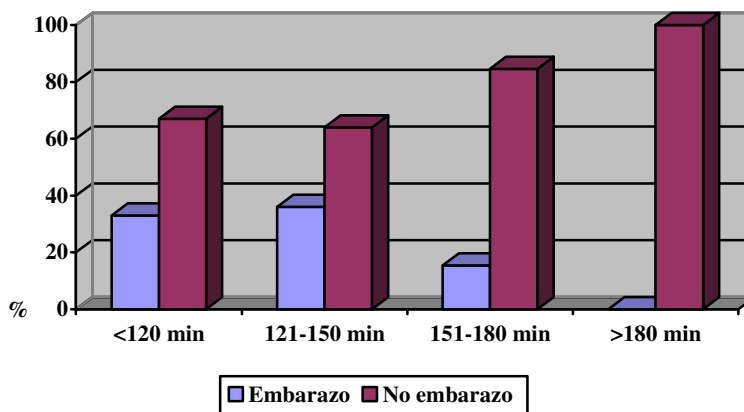
**Tabla 10.-Intervalo obtención-procesamiento**



|           | Nº | Embarazos | No embarazos | Fisher test |
|-----------|----|-----------|--------------|-------------|
| ≤ 45 min. | 8  | 5 (62.5%) | 3 (37.5%)    |             |
| < 60 min. | 18 | 8 (44.4%) | 10 (55.5%)   | 0.6728      |
| < 90 min. | 39 | 12(30.7%) | 27 (69.2%)   | 0.3834      |
| > 90 min. | 11 | 2 (18.1%) | 10 (90.9%)   | 0.4713      |

No significativo

**Tabla 11.-Intervalo Obtención –Inseminación**

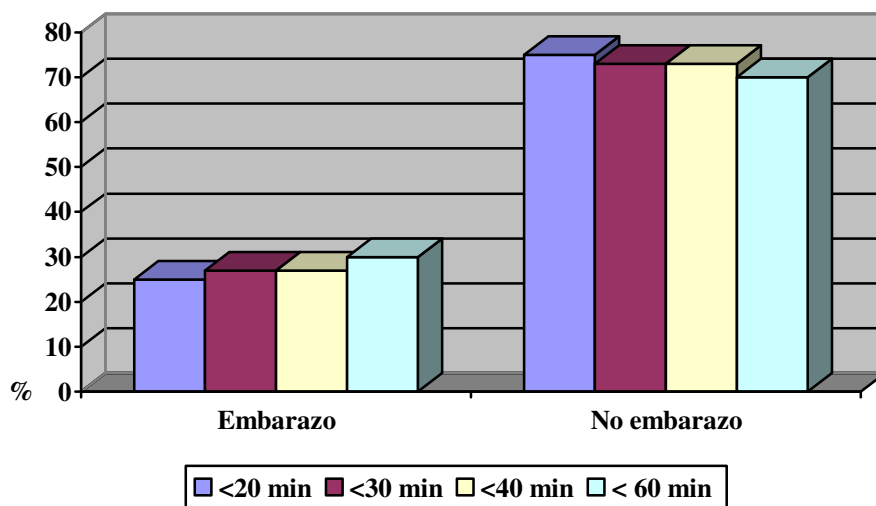


|              | Nº | Embarazo  | No embarazo | Fisher test |
|--------------|----|-----------|-------------|-------------|
| <120 min.    | 12 | 4 (33%)   | 8 (67%)     |             |
| 121-150 min. | 22 | 8 (36%)   | 14 (64%)    | 1           |
| 151-180 min. | 13 | 2 (15.3%) | 11 (84.6%)  | 0.2885      |
| >180         | 3  | 0 (0%)    | 3 (100%)    | 0.5500      |

No significativo

Realizamos la Inseminación con un intervalo de tiempo desde la capacitación, inferior a 60 min., en el 98% de los casos, no encontrando diferencias significativas en los resultados al fragmentar los tiempos: <20 min. (25% emb/ciclo), <30 min. (27% emb/ciclo), <40 min. (27% emb/ciclo), < 60 min. (29% emb/ciclo) (Tabla 12).

**Tabla 12.-** Intervalo procesamiento - Inseminación



|          | Nº | Embarazos | No embarazos | Fisher test |
|----------|----|-----------|--------------|-------------|
| <20 min. | 28 | 7 (25%)   | 21 (75%)     |             |
| <30 min. | 37 | 10 (27%)  | 27 (73%)     | 1           |
| <40 min. | 47 | 13 (27%)  | 34 (73%)     | 1           |
| <60 min. | 50 | 14 (28%)  | 35 (72%)     | 1           |

No significativo

## 2. Resultados Enzimáticos

### 2.1 Actividad enzimática en medio capacitante

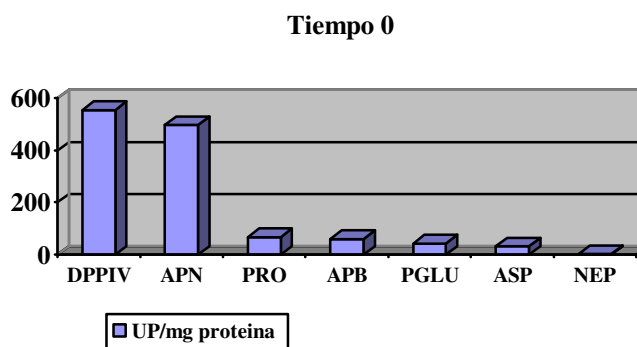
Se ha encontrado actividad enzimática en la fracción espermática del semen, para todas las peptidasas estudiadas: APN, DPPIV, PRO, APB, PGLU, ASP y NEP. Y esta actividad se ha mantenido durante las cuatro horas posteriores a la capacitación seminal.

La actividad enzimática, fue diferente según el enzima estudiado. En las muestras analizadas inmediatamente a la

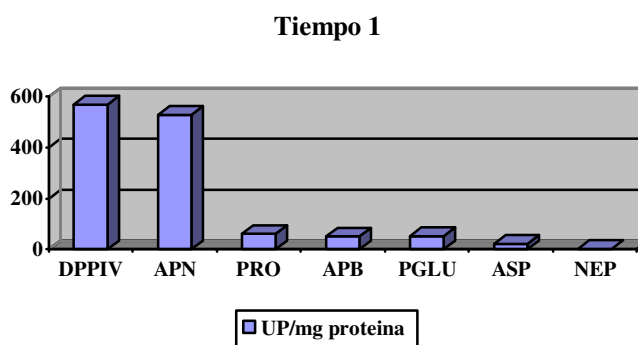
preparación celular (Tiempo 0), la mayor actividad corresponde a la DPPiV con 555,10 UP/ mg de proteína, seguida de la APN, con una actividad de 498.50. Observamos una disminución de hasta 10 veces en la actividad del resto de los enzimas estudiados (PRO = 67.61; APB = 59.94; PGLU = 42.28; ASP = 31.51). La actividad de la NEP fue baja (1.71) (Tabla 13).

Este patrón de actividad se mantiene en las muestras estudiadas a la hora (Tiempo 1), dos horas (Tiempo 2), tres horas (Tiempo 3) y cuatro horas (Tiempo 4) (Tablas 14 a 17).

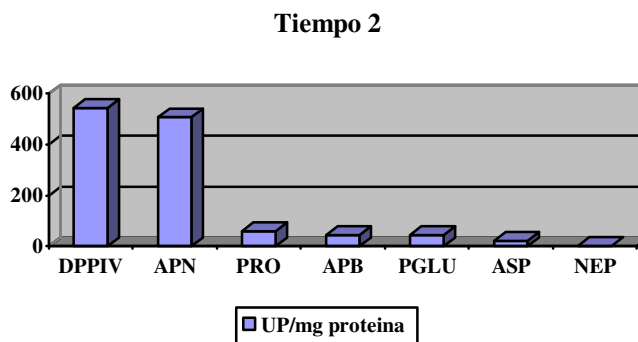
**Tabla 13.-** Actividad enzimática en tiempo 0



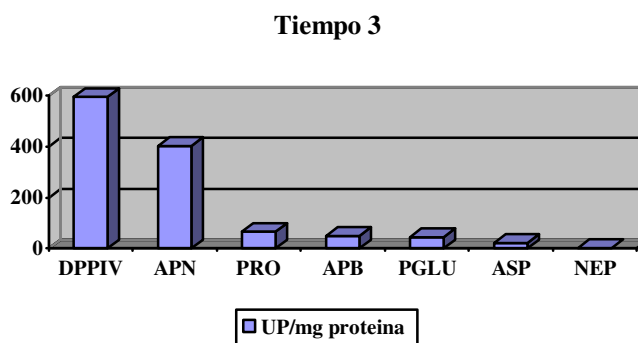
**Tabla 14.-** Actividad enzimática en tiempo 1



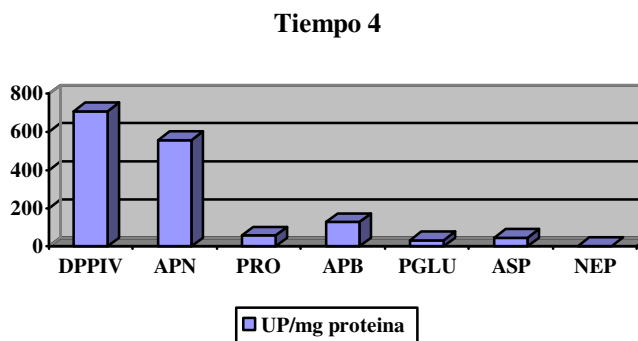
**Tabla 15.-** Actividad enzimática en tiempo 2



**Tabla 16.-** Actividad enzimática en tiempo 3



**Tabla 17.-** Actividad enzimática en tiempo 4



## 2.2. Actividad enzimática en medio capacitante en el tiempo

### 2.2.1. Desde la capacitación

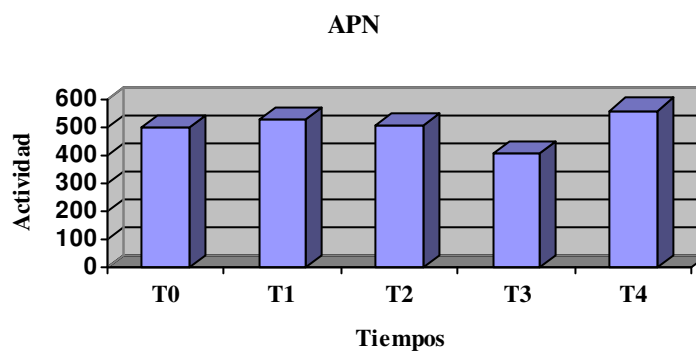
Hemos analizado la variación horaria de la actividad de cada una de las enzimas estudiadas desde la capacitación (tiempo 0), durante 4 horas, no encontrando diferencias significativas en la mayoría de los enzimas estudiados (Tablas 18 A 25).

Solamente en la APB y en la APS se encuentran incrementos significativos de la actividad a las cuatro horas (APB:  $p < 0.0001$ ; ASP:  $p = 0.0134$ )

**Tabla 18.-** Actividad enzimática de 0 a 4 horas de APN, DPPIV, PGLU, PRO, NEP, APB, ASP

| Tiempo en medio capacitante |         |         |         |         |         |
|-----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                             | T0      | T1      | T2      | T3      | T4      |
| <b>APN</b>                  | 498,500 | 528,300 | 507,600 | 403,400 | 558,700 |
| ES                          | 26.51   | 21.81   | 42.55   | 24.54   | 26.80   |
| <b>DPPIV</b>                | 555,100 | 568,100 | 543,900 | 594,400 | 709,300 |
| ES                          | 27.83   | 27.87   | 32.26   | 33.22   | 29.08   |
| <b>PGLU</b>                 | 42,280  | 51,450  | 44,850  | 45,010  | 32,550  |
| ES                          | 2.30    | 1.75    | 1.33    | 1.49    | 1.61    |
| <b>PRO</b>                  | 67,610  | 60,820  | 59,880  | 66,000  | 58,170  |
| ES                          | 2.52    | 1.94    | 1.92    | 2.02    | 4.93    |
| <b>NEP</b>                  | 1,712   | 1,647   | 1,435   | 1,299   | 1,444   |
| ES                          | 0.05    | 0.03    | 0.05    | 0.04    | 0.08    |
| <b>APB</b>                  | 59,940  | 50,640  | 44,010  | 48,670  | 128,620 |
| ES                          | 0.23    | 0.22    | 0.15    | 0.24    | 0.57    |
| <b>ASP</b>                  | 31,510  | 21,440  | 21,350  | 21,480  | 46,040  |
| ES                          | 1.65    | 0.35    | 0.61    | 0.46    | 1.28    |

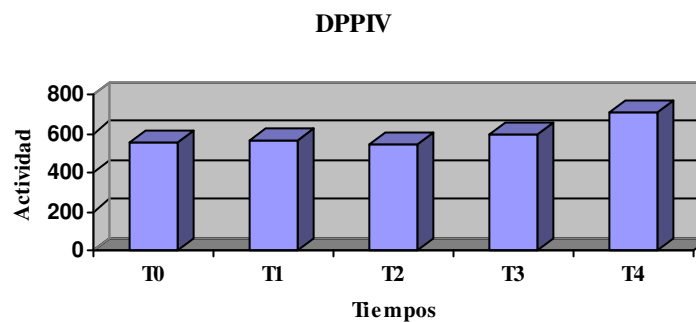
**Tabla 19.-** Actividad enzimática de la APN de 0 a 4 horas



| APN   | T0    | T1    | T2    | T3    | T4    |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Media | 498.5 | 528.3 | 507.6 | 403.4 | 558.7 |
| ES    | 26.51 | 21.81 | 42.55 | 24.54 | 26.80 |

p=0.7199 (NS)

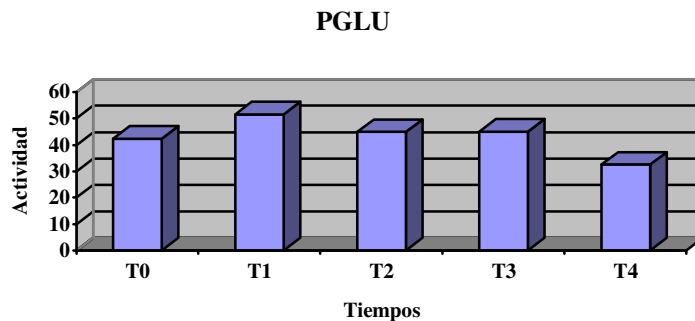
**Tabla 20.-** Actividad enzimática de la DPPIV de 0 a 4 horas



| DPPIV | T0    | T1    | T2    | T3    | T4    |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Media | 555.1 | 568.1 | 543.9 | 594.4 | 709.3 |
| ES    | 27.83 | 27.87 | 32.26 | 33.22 | 29.06 |

p=0.6110 (NS)

**Tabla 21.-** Actividad enzimática de la PGLU de 0 a 4 horas

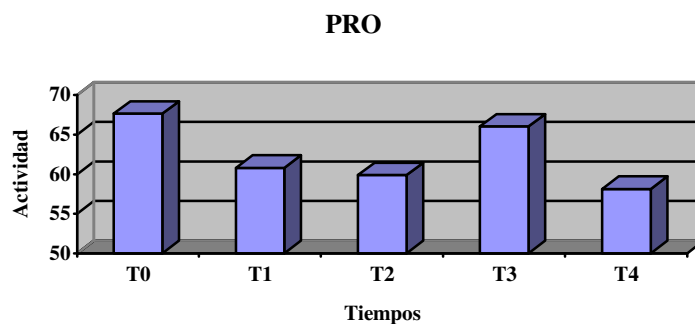


|       | T0    | T1    | T2    | T3    | T4    |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Media | 42.28 | 51.45 | 44.85 | 45.01 | 32.55 |
| ES    | 2.30  | 1.75  | 1.33  | 1.49  | 1.61  |

p =0.3768

(NS)

**Tabla 22.-** Actividad enzimática de la PRO de 0 a 4 horas

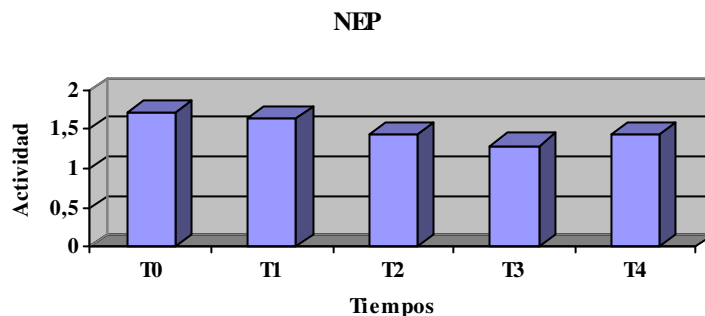


|       | T0    | T1    | T2    | T3   | T4    |
|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| Media | 67.61 | 60.82 | 59.88 | 66   | 58.17 |
| ES    | 2.52  | 1.94  | 1.92  | 2.02 | 4.93  |

P=0.9668 (NS)



**Tabla 23.-** Actividad enzimática de la NEP de 0 a 4 horas

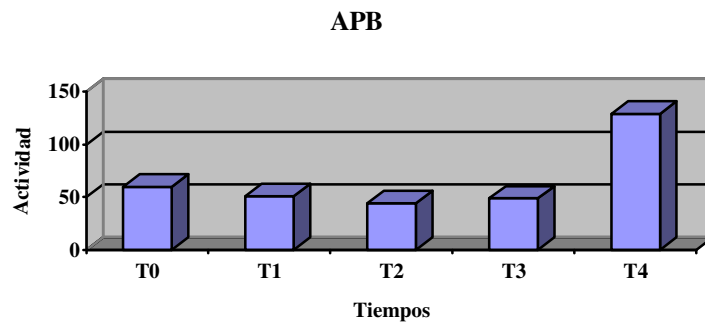


|       | T0    | T1    | T2    | T3    | T4    |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Media | 1.712 | 1.647 | 1.435 | 1.299 | 1.444 |
| ES    | 0.05  | 0.03  | 0.05  | 0.04  | 0.08  |

P =

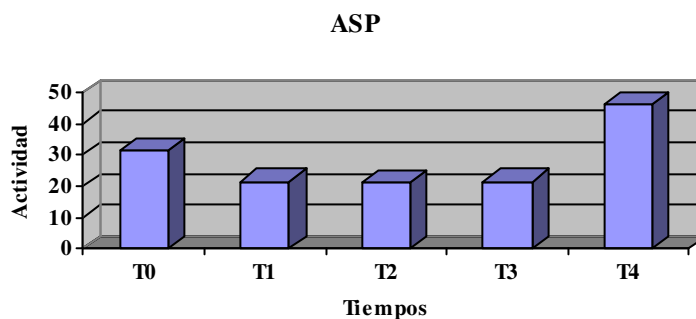
0.5011 (NS)

**Tabla 24.-** Actividad enzimática de la APB de 0 a 4 horas



|       | T0    | T1    | T2    | T3    | T4     |
|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Media | 59.94 | 50.64 | 44.01 | 48.67 | 128.63 |
| ES    | 2.36  | 2.26  | 1.56  | 2.49  | 5.75   |

P<0.05

**Tabla 25.-** Actividad enzimática de la ASP de 0 a 4 horas

|       | T0    | T1    | T2    | T3    | T4    |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Media | 31.51 | 21.44 | 21.35 | 21.48 | 46.04 |
| ES    | 1.65  | 0.35  | 0.61  | 0.46  | 1.28  |

$P < 0.05$

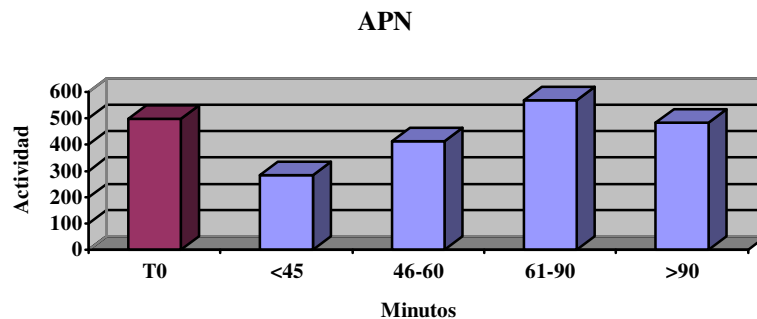
### 2.2.2. Desde la obtención seminal

Según las recomendaciones de la OMS, las muestras seminales para tratamientos reproductivos, deben ser procesadas antes de las dos horas desde su obtención y preferentemente dentro de la primera hora, aunque biológicamente la actividad espermática es inmediata, tras la eyaculación.

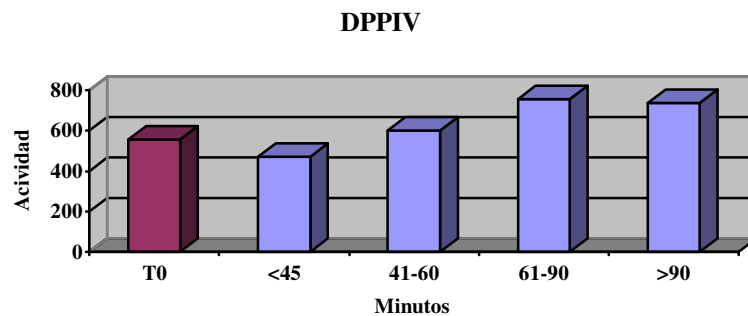
Estudiamos la actividad enzimática en las muestras estudiadas, según intervalos de tiempo desde la obtención hasta el procesamiento de: <45 min., 46-60 min., 61-90 min. y > de 90 min.

Observamos una disminución de la actividad enzimática en el tiempo 0, cuando las muestras fueron procesadas antes de los 45 minutos desde su obtención en la APN (284 vs. 498), DPPIV (471 vs. 555) y PGLU (14.3 vs. 42.88), con un aumento progresivo de su actividad según se prolonga el tiempo hasta el inicio de la capacitación (Tablas 26 a 28).

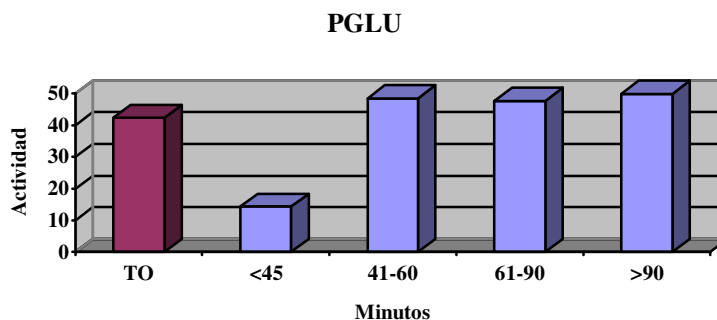
**Tabla 26.-** Actividad enzimática a tiempo 0 de la APN, según intervalo de tiempo (minutos) desde la obtención hasta el inicio de la capacitación



**Tabla 27.-** Actividad enzimática a tiempo 0 de la DPPIV, según intervalo de tiempo (minutos) desde la obtención hasta el inicio de la capacitación

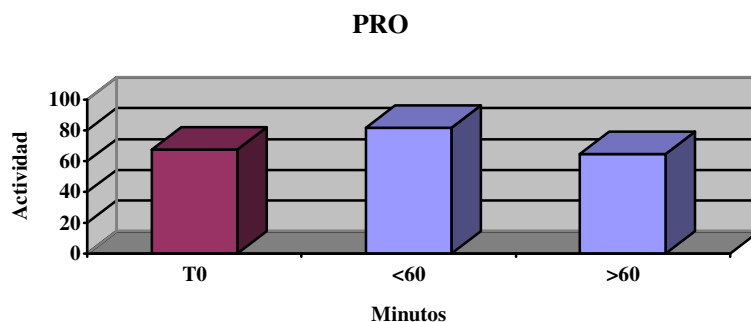


**Tabla 28.-** Actividad enzimática a tiempo 0 de la PGLU, según intervalo de tiempo (minutos) desde la obtención hasta el inicio de la capacitación

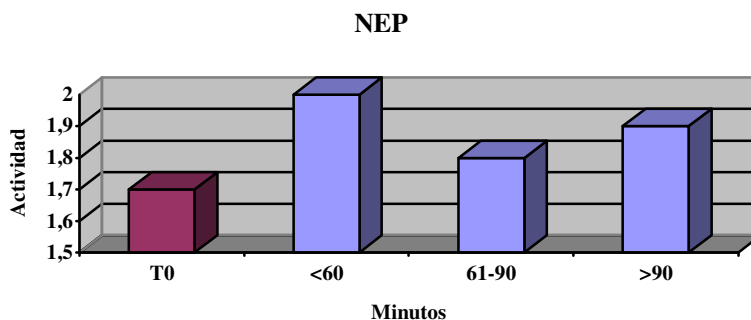


El resto de los enzimas estudiados, por el contrario, presentaban una mayor actividad al disminuir el tiempo hasta el procesamiento, disminuyéndola, al aumentar el intervalo desde la obtención: PRO 81.6 vs. 67.6; NEP 2 vs. 1.7; APB 87.8 vs. 59.9; ASP 57.4 vs. 31.5 (Tabla 29 a 32).

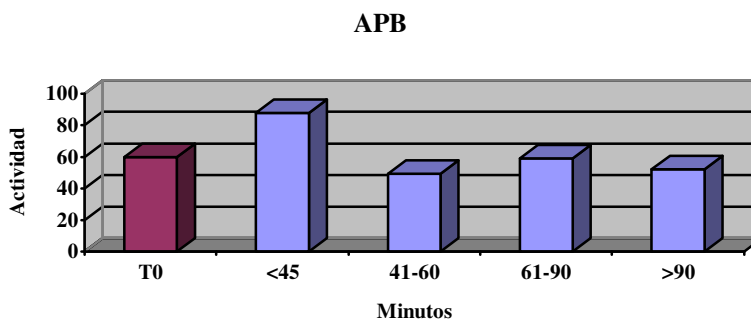
**Tabla 29.-** Actividad enzimática a tiempo 0 de la PRO, según intervalo de tiempo (minutos) desde la obtención hasta el inicio de la capacitación.



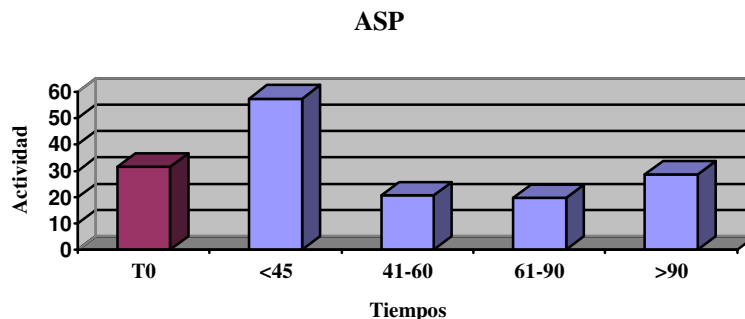
**Tabla 30.-** Actividad enzimática a tiempo 0 de la NEP, según intervalo de tiempo (minutos) desde la obtención hasta el inicio de la capacitación.



**Tabla 31.-** Actividad enzimática a tiempo 0 de la APB, según intervalo de tiempo (minutos) desde la obtención hasta el inicio de la capacitación.



**Tabla 32.-** Actividad enzimática a tiempo 0 de la ASP, según intervalo de tiempo (minutos) desde la obtención hasta el inicio de la capacitación

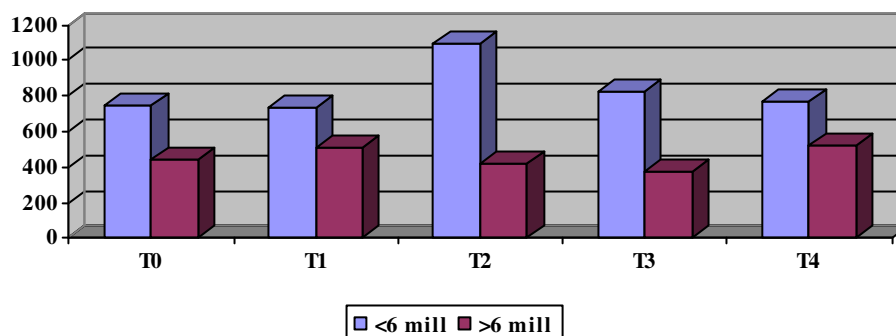


### 3. Actividad enzimática y correlación clínica

#### 3.1. Actividad enzimática y conteo espermático

Al relacionar la actividad enzimática, con el número de espermatozoides recuperados con movilidad activa y capacitados, solo encontramos correlación para la actividad enzimática de la APN, observando una mayor actividad en los recuentos  $\leq$  a 6 millones: 748 UPA vs. 446 en los recuentos superiores a 6 millones. Esta correlación se mantiene, durante las cuatro horas estudiadas, siendo más marcadas a la segunda y tercera hora tras la capacitación, donde se observa una actividad triplicada y duplicada, respectivamente, en las muestras con menor número de espermatozoides (Tabla 33).

**Tabla 33.-** Actividad enzimática de la APN, según número de espermatozoides y tiempo (horas) desde la capacitación

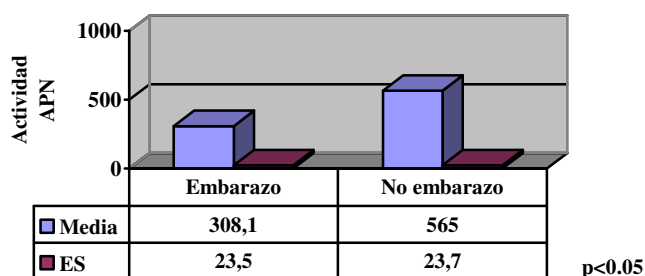


### 3.2 Actividad enzimática y embarazo

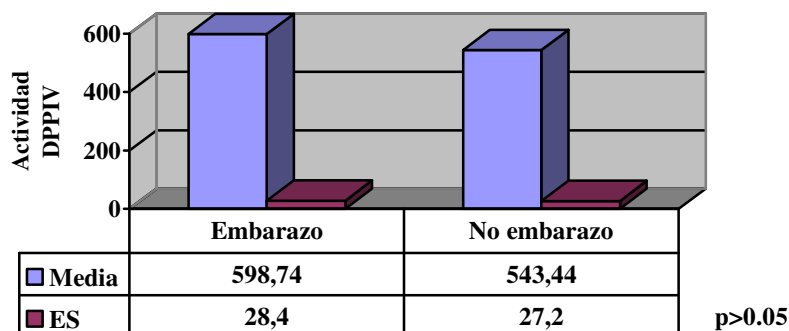
La integridad funcional espermática tiene como objetivo conseguir una correcta fertilización. Por ello, relacionamos la actividad enzimática de los enzimas estudiados con la obtención de un embarazo tras la realización de la Inseminación Intrauterina con las muestras sujeto de estudio.

No encontramos diferencias significativas entre embarazo y no embarazo al estudiar la actividad enzimática en el T0, en la DPPIV, PGLU, PRO, NEP, APB y ASP (Tablas 35 a 40). Sin embargo la actividad de la APN fue significativamente menor en las muestras que embarazaron ( $p < 0.05$ ) (Tabla 34).

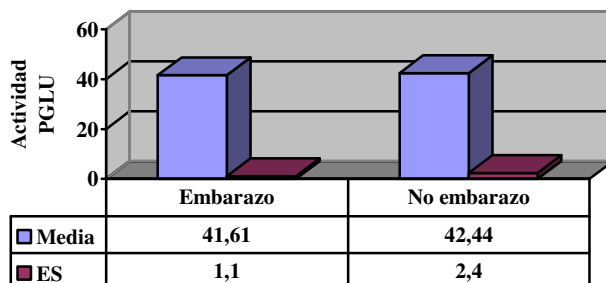
**Tabla 34.-** Actividad enzimática de la APN en muestras con y sin embarazo



**Tabla 35.-** Actividad enzimática de la DPPIV en muestras con y sin embarazo

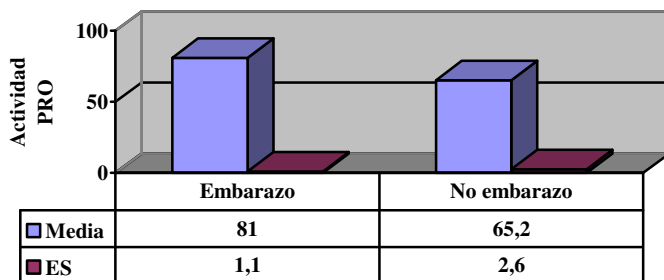


**Tabla 36.-** Actividad enzimática de la PGLU en muestras con y sin embarazo



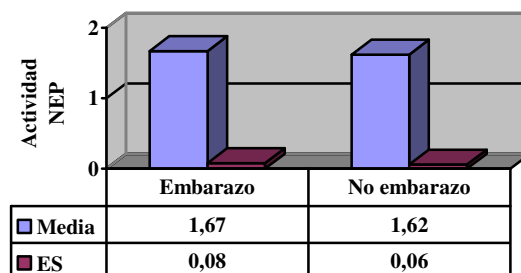
p>0.05

**Tabla 37.-** Actividad enzimática de la PRO en muestras con y sin embarazo



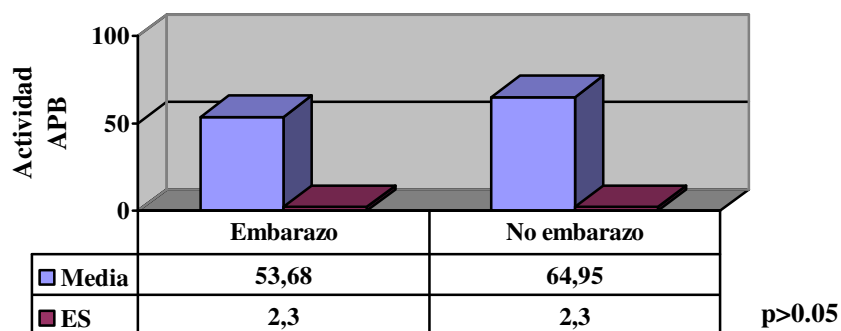
p>0.05

**Tabla 38.-** Actividad enzimática de la NEP en muestras con y sin embarazo

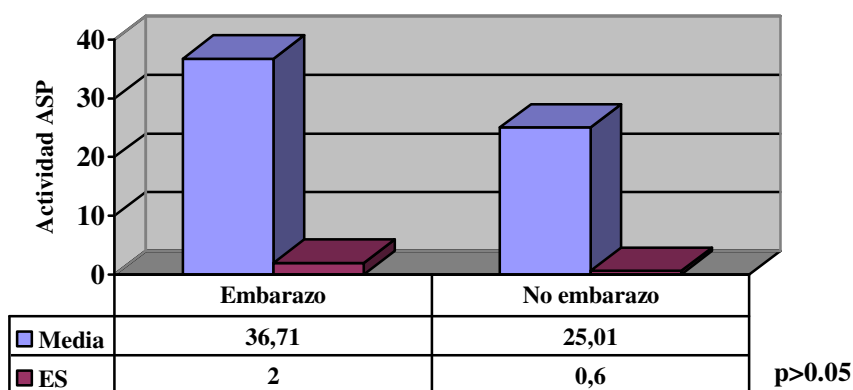


p>0.05

**Tabla 39.-** Actividad enzimática de la APB en muestras con y sin embarazo



**Tabla 40.-** Actividad enzimática de la ASP en muestras con y sin embarazo

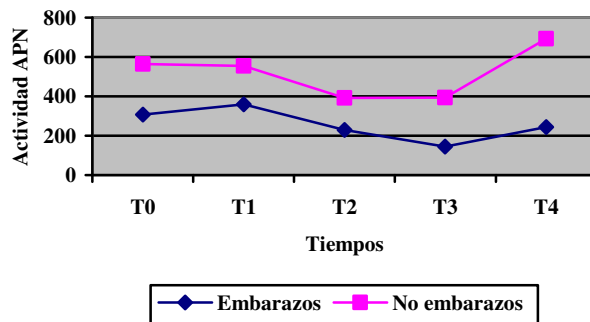


### 3.3. Actividad enzimática, embarazo y variación en el tiempo

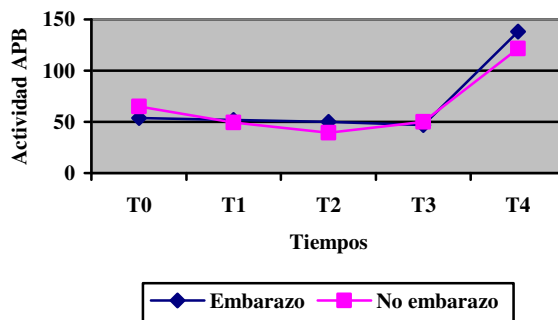
Las variaciones de la actividad enzimática en las muestras estudiadas, mantiene un comportamiento similar y paralelo a lo largo del tiempo de observación, en todas las enzimas estudiadas, (tablas 41 a 45), con la excepción de la DPPIV, que aumenta su actividad un 40% en la tercera hora (Tabla 47) y la PRO, que prácticamente la duplica en la cuarta hora, en el grupo de los embarazos, mientras que la actividad en el grupo de no embarazo, se mantiene sin cambios desde el tiempo 0 (Tabla 46).



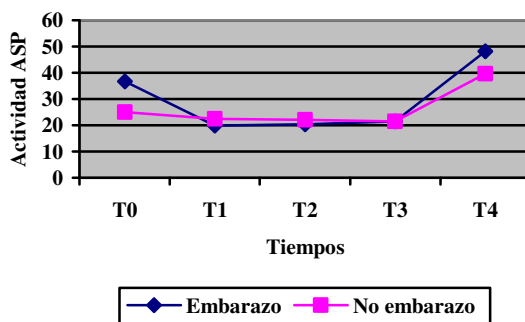
**Tabla 41.-** Actividad de la APN en el tiempo (horas) en muestras con y sin embarazo



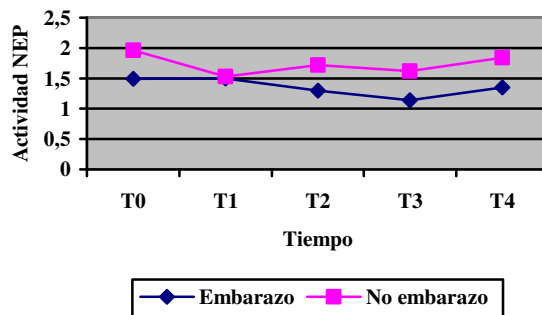
**Tabla 42.-** Actividad de la APB en el tiempo (horas) en muestras con y sin embarazo



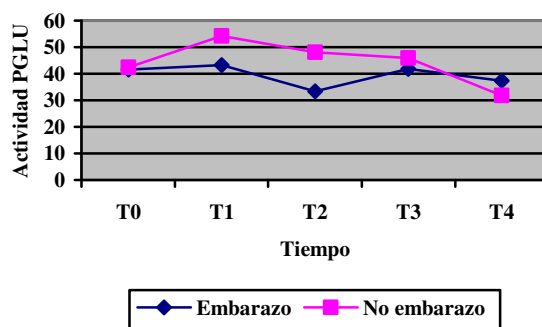
**Tabla 43.-** Actividad de la ASP en el tiempo (horas) en muestras con y sin embarazo



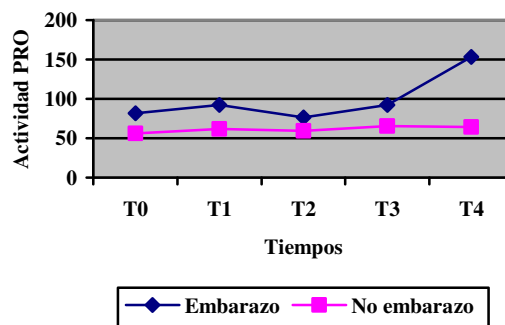
**Tabla 44.-** Actividad de la NEP en el tiempo (horas) en muestras con y sin embarazo



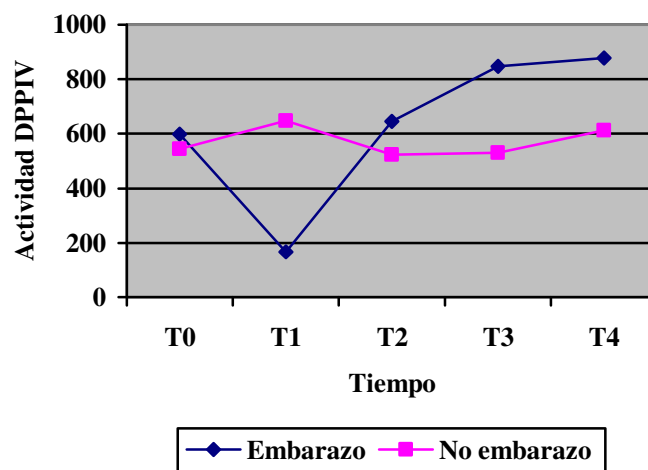
**Tabla 45.-** Actividad de la PGLU en el tiempo (horas) en muestras con y sin embarazo



**Tabla 46.-** Actividad de la PRO en el tiempo (horas) en muestras con y sin embarazo



**Tabla 47.-** Actividad de la DPPIV en el tiempo (horas) en muestras con y sin embarazo





## **IV. DISCUSIÓN**



## 1. SOBRE LOS RESULTADOS CLÍNICOS OBTENIDOS

En el momento actual un 15% de parejas necesitan ayuda médica para conseguir su deseo de paternidad. Algunas de estas parejas realizarán tratamiento de Inseminación Intrauterina. Este método de Reproducción Asistida está indicado en casos de esterilidad de origen cervical, patología seminal leve-moderada, anovulación, endometriosis y esterilidad de causa desconocida. Es necesario que la mujer tenga una buena reserva ovárica, y al menos una trompa permeable. La muestra seminal debe permitir la recuperación para la inseminación de al menos 5 millones de espermatozoides móviles (a+b).

En la literatura se han referido diversos factores pronósticos del resultado de las Inseminaciones: edad de la mujer, duración de la infertilidad, etiología de la infertilidad, contaje espermático, número de folículos maduros, concentración de E2 el día de la administración de la HCG y tipo de catéter usado. Sin embargo, los diferentes investigadores no están de acuerdo sobre la naturaleza y clasificación de estos criterios.

La edad de la mujer era el predictor más específico de éxito en todas las indicaciones. Así Merviel (2010) refiere una tasa de embarazo en curso en el 38,5% de las mujeres menores de 30 años versus 12,5 % para las mayores de 40 años. Nuojua-Huttunen y cols. (1999) encontraron una tasa de embarazo por ciclo 13,7% entre los 811 ciclos de inseminación intrauterina en mujeres menores de 40 años, el 4,1% para los mayores de 40 años, y ningún embarazo después de 42 años de edad. Sorprendentemente, en el estudio de Brzechffa (1998), la edad de las mujeres menores de 40 años no tenía influencia en la tasa de embarazo después de la estimulación con clomifeno citrato y HMG. Por el contrario, Bronte (1999) examinó 9963 ciclos y refirió una diferencia relacionada con la edad en la tasa de embarazo: un 18,9% hasta los 26 años, el 13,9% entre 26 y 30, 12,4% entre 31 y 35, 11,1% entre 36 y 40, el 4,7% entre 41 y 45, y 0,5 % mayores de 45 ( $P < .001$ ). Por último, Goverde (2000) declaró que la edad de la mujer es el factor más importante que influye en la probabilidad de embarazo, sea cual sea el tratamiento elegido (IAC o FIV). En el grupo estudiado la edad de las mujeres era inferior a 40 años, con una edad media de 36 años (rango 33-39 años) y aunque no hubo diferencias significativas entre el grupo con embarazo y el no gestante, sí se observa una menor rango de edad entre las gestantes (32-36 vs. 31,6-38).

Otro factor de éxito para el embarazo después de la inseminación intrauterina es la duración de la esterilidad (Erdem y cols, 2008). De hecho, se ha observado a menudo que cuanto menor sea la duración de la esterilidad, mayor será la probabilidad de embarazo. Nuojua - Huttunen y cols. (1999) informaron de diferentes tasas de embarazo si la esterilidad no superaba los 6 años (14,2 % vs. 6,1%). Sin embargo otros autores no encuentran esta diferencia pronostica. En nuestro grupo de estudio no encontramos como factor pronostico la duración de la esterilidad, pero todas las parejas presentaban una esterilidad inferior a los 5 años. No hubo diferencias significativas en la duración de la esterilidad entre las parejas embarazadas y las que no obtuvieron gestación.

El número de folículos > 16 mm es un importante factor pronóstico. Bronte y cols. (1999) analizando 9963 ciclos encuentran una tasa de embarazo del 7.6% para un folículo, 10.1% para dos folículos, 8.6% para tres folículos, y 14% para cuatro folículos ( $P<.001$ ). Belaisch-Allart y cols. (1988) (con 880 ciclos) confirman estos resultados, con una tasa de embarazo clínico/ciclo de 13.8% con uno o dos folículos y 19.6% con al menos tres folículos. En nuestro estudio, se reclutaron un promedio de 4.38 folículos, no encontrando diferencias significativas entre el grupo de gestantes y no gestantes. La tasa de embarazo/ciclo, se duplicó cuando el reclutamiento era de mas de tres folículos (16% vs. 32%).

Los estudios epidemiológicos indican que una edad paterna superior a 40 años, es un factor de riesgo que incrementa la infertilidad y la tasa de abortos, sobre todo, si la mujer tiene más de 35 años (de la Rochebrochard y cols., 2005). En reproducción asistida, es un factor controvertido. Así, Belloc (2008) en una revisión retrospectiva de 17000 ciclos, observó que la edad paterna avanzada influía negativamente en la consecución de embarazo y positivamente en la producción de abortos. Sin embargo, Bellver (2008), no encontró cambios en la calidad embrionaria, tasa de implantación ni en la tasa de abortos en 2700 ciclos de FIV. La edad media de nuestros pacientes fue de 36 años, pero el 20% superaban los 40 años. En este grupo la tasa de embarazo fue del 10% vs. 32.5% en menores de 40 años El aumento de la necrozoospermia y las alteraciones del DNA espermático, asociadas al incremento de la edad paterna, pueden justificar esta influencia en los resultados reproductivos (Belloc y cols., 2008).

Se ha sugerido que el número de espermatozoides móviles inseminados es un factor predictivo potencial. Según Sakhel y cols.



(2005), la tasa de embarazo por ciclo es del 8% con menos de 500.000 espermatozoides inseminados frente al 30,6 % para un recuento superior a 5 millones de espermatozoides móviles. En los 9963 ciclos estudiados por Bronte y cols. (1999), la tasa de embarazo fue de alrededor del 11 % por ciclo, cuando se inseminaron entre 4 y 6 millones de espermatozoides móviles. Un aumento adicional en el número no mejoró la tasa, pero el valor cae significativamente si el recuento desciende por debajo de 2 millones (5%). En nuestra Unidad, una recuperación inferior a 5 millones de espermatozoides móviles, es indicación de Fertilización *in Vitro*. En nuestra serie el REM siempre fue superior a 5 millones, no encontrando diferencias entre las pacientes con o sin embarazo (9.4% vs. 9.9%)

La influencia de la morfología espermática en el resultado del tratamiento es controvertida. Burr y cols. (1996) observaron una caída en la tasa de embarazo del 18,2 % al 4,3 % por ciclo, cuando teratozoospermia alcanza el 90% y según Belaisch-Allart y cols. (1988), una tasa de teratozoospermia mayor del 80% se opone a la IAC. Por otra parte, Wainer y cols. (2004) analizaron 2564 IACs e informó de que las tasas de embarazo no se vieron afectadas significativamente por teratozoospermia. En nuestra serie de estudio, los espermatozoides presentaban una morfología media del 12.25% de formas normales, no encontrando diferencias significativas entre muestras que consiguieron embarazo o no, habiendo observado gestaciones con un 7% de formas normales. Sin embargo, el verdadero potencial de este parámetro tiene algunas limitaciones debido a varios factores metodológicos: las diferencias en los sistemas de clasificación, la influencia del método de tinción utilizada, la naturaleza subjetiva de la evaluación de la morfología de los espermatozoides, y una disminución regular del umbral de la OMS. Según los criterios estrictos de Tygerberg, que es la clasificación mundial de uso más frecuente, se ha comunicado una disminución de la fertilidad cuando la tasa de formas normales fue menor o igual a 4 %.

Los intervalos de tiempo entre la recogida de semen, procesamiento e inseminación, pueden afectar a los resultados de la Inseminación Intrauterina. Yavas y Selub (2004) realizaron un estudio retrospectivo, encontrando mejores resultados cuando la muestra era obtenida en la clínica y no en casa. Intervalos cortos entre la obtención y la preparación, desde la preparación a la inseminación y desde la obtención a la inseminación se asociaron a una mayor tasa de embarazos comparada con la obtenida en casa, que ocasiona intervalos de tiempo más largos. Resultados similares son referidos por Sroga (2008). Un intervalo superior a 30 minutos desde la

recogida hasta el inicio de la preparación seminal reduce la tasa de embarazos del 20.6%/ciclo a 14.9%. Para maximizar los resultados de embarazo IAC, las muestras de semen deben recogerse en la clínica y no en casa, procesándose inmediatamente después de la licuefacción y dentro de los 30 minutos desde la recolección, y realizando la Inseminación tan pronto como se termine la preparación seminal, siendo el intervalo de tiempo final inferior a los 90 minutos. No obtuvieron embarazos en muestras procesadas > 60 minutos tras la obtención seminal (Yavas, 2004). Nosotros no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas al comparar los tiempos entre obtención e inicio del procesamiento seminal, pero sí una tendencia a una disminución de la tasa de embarazos por ciclo al aumentar el tiempo hasta el procesamiento seminal: <45 min. (62.5%), <60 min. (44.4%), <90 min. (33.3%) y > 90 min. (16%), confirmando las observaciones de Yavas. Sin embargo, obtuvimos dos gestaciones en muestras seminales capacitadas a los 100 y 110 minutos desde la obtención seminal.

Por contra, Alexander (2005) en una serie de 210 ciclos, no encuentra diferencias al estudiar los ciclos con gestación y sin ella, en los mismos intervalos de tiempo, pero en todos ellos el procesamiento de las muestras se realizó en un tiempo medio inferior a los 30 minutos desde la obtención, observándose un mayor rango para los ciclos sin embarazo (6-90 min. vs. 6-36 min.). Jee Song (2007) tampoco encuentra diferencias en los intervalos de tiempo entre embarazadas y no embarazadas, pero al igual que Yavas, no se obtuvieron gestaciones en ninguno de los 7 ciclos en que la exposición al plasma seminal supero los 60 minutos, manteniendo tiempos inferiores a 100 minutos entre la obtención seminal y la Inseminación, en todos los ciclos.

El límite máximo de intervalo establecido por la OMS desde la recogida seminal hasta su entrega al laboratorio es de una hora. Este límite es aplicable para "*el análisis diagnóstico del semen*", ya que se mantiene una aceptable movilidad espermática durante las primeras 2 horas, lo cual no compromete el estudio clínico de la muestra (Appell y cols., 1977) (Licht y cols., 2008), pero este límite, podría no ser aplicable a la "*transformación terapéutica seminal*"

La capacidad fertilizante del espermatozoide, no se limita solo a su movilidad, pudiendo intervenir otros factores lesivos en función del tiempo de exposición al plasma seminal como la exposición a los factores decapacitantes (Blegey y Quinn, 1982) que provocarían una prevención irreversible de la capacitación espermática y su incapacidad fertilizadora, así como la exposición prolongada a los radicales libres

(ROS: reactive oxygen species) asociados a una menor capacidad fertilizante de los espermatozoides (Zorn y cols., 2003) ya que inducen peroxidación lipídica, daño en el ADN y la apoptosis de los espermatozoides (Kothari y cols., 2010). Nuestros datos y los de Yavas parecen validar las recomendaciones realizadas por Mortimer en 1994, de realizar el procesamiento seminal, en el menor tiempo posible desde su obtención

Aunque la movilidad de los espermatozoides aislados del plasma seminal se podrían mantener por períodos de hasta 24 horas a 37 ° C (Gorus y cols., 1983), se recomienda realizar la Inseminación lo antes posible. Realizamos la Inseminación con un intervalo de tiempo inferior a 60 min., en el 98% de los casos y al igual que Yavas, no encontramos diferencias significativas en los resultados al fragmentar los tiempos: <20 min. (25% emb/ciclo), <30 min. (27% emb/ciclo), <40 min. (27% emb/ciclo), < 60 min. (29% emb/ciclo) En el único caso en que la Inseminación se realizó superando los 60 min. desde la capacitación, no se obtuvo embarazo.

Según el trabajo de Yavas, se necesita un intervalo de tiempo desde la capacitación a la Inseminación de tres horas, para llevar la probabilidad de embarazo a cero. Esto sugiere que la exposición de los espermatozoides al medio de lavado, es menos lesivo para su capacidad fertilizante, que su exposición al plasma seminal, donde la probabilidad de embarazo llega a cero, tras hora y media de exposición. La combinación de sustancias de los medios de lavado espermática mimetizan la composición del fluido tubárico (Quinn y cols., 1985). Sin embargo, la tasa de embarazo disminuye cuando se superan los 60 minutos. Un consumo excesivo de las fuentes de energía (glucosa y fructosa) presentes en el medio de lavado seminal (Williams y Ford, 2001) o una capacitación prematura por ausencia de factor decapacitante o por inducción autocrina (Wu y cols., 2001) puede explicar esta pérdida funcional del espermatozoide en función del tiempo.

El tiempo medio invertido desde la obtención de la muestra y la Inseminación en nuestro estudio, fue de 142 minutos. No encontramos diferencias significativas para las tasas de embarazo/ciclo, en los intervalos de tiempo <120 min., 121-150 min., y >150 min. Sin embargo cuando el tiempo invertido fue superior a 150 minutos la tasa de embarazo/ciclo se redujo a la tercera parte (11% vs. 35%). Este límite de tiempo no coincide con el referido por Yavas, que lo establece en 120 minutos. Pero sí coincidimos, al encontrar una ausencia de embarazos, cuando se superan las tres horas entre la obtención y la Inseminación.

Existen pocos estudios relacionados con la pérdida fecundante del espermatozoide en función del tiempo, tras su capacitación en el laboratorio, por lo que uno de los objetivos de esta tesis fue averiguar las variaciones de la actividad aminopeptidásica en las muestras capacitadas tras una, dos, tres y cuatro horas de finalizar el procedimiento de lavado seminal.

## **2. REGULACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS Y FERTILIDAD**

### **2.1. Sobre la distribución enzimática obtenida.**

Los primeros trabajos relacionados con el estudio de la actividad peptidásica, su ubicación, características bioquímicas y sustratos, se remontan a principios de la década de los años 60 del siglo pasado pero, posiblemente, el verdadero interés por el estudio de las mismas surgió a finales de la década de los 70 con el descubrimiento de que la inhibición del ECA (enzima convertidor de angiotensina), una peptidil dipeptidasa (A), tenía efectos antihipertensivos (Ondetti y cols., 1977).

A partir de este momento, se multiplicaron las publicaciones relacionadas con el estudio de las actividades proteolíticas, la regulación de sus péptidos bioactivos y los receptores de los mismos, en diversas situaciones tanto fisiológicas como patológicas, tratando además de encontrar aplicaciones clínicas a los mismos.

En cualquier caso, la mayoría de los estudios estuvieron encaminados a la descripción de las actividades enzimáticas en sistema nervioso central, posiblemente debido a la declaración de los años 90 como la "década del cerebro".

A partir del nuevo siglo, han venido también apareciendo diversos estudios de la actividad proteolítica, tanto fisiológica como patológica, en otros tejidos como músculo esquelético, corazón, hígado y riñón. Sin embargo, el primer ensayo experimental que implicaba estas enzimas en la fertilidad, se remonta precisamente al año 2002, en que Fernández y cols. describieron los niveles de actividad aminopeptidásica en diversas fracciones de semen humano normozoospermico. Los altos valores de actividad observados en las diferentes fracciones espermáticas estudiadas, sugirieron que tanto las peptidasas como sus sustratos naturales podrían estar implicados en la fisiología seminal, a través de la regulación de péptidos fisiológicamente activos tanto en testículos/epidídimo, como en el propio espermatozoide.

Estos resultados pueden ser cualitativa pero no cuantitativamente comparados con los presentados en el presente trabajo de investigación, ya que los resultados de Fernández fueron realizados en semen de donante fértil (normozoospermico) y no tratado, es decir, los ensayos se realizaron directamente sobre las muestras seminales sin capacitar. Sin embargo, los resultados presentados en este proyecto se han obtenido de muestras astenozoospermicas capacitadas que contenían exclusivamente espermatozoides. En cualquier caso, parece que en la fracción espermática, los niveles peptidásicos son inferiores cuando la movilidad esta disminuida.

Fernández y cols. realizaron los ensayos en varias fracciones seminales (liquido seminal, fracción espermática citosólica, fracción de membrana y prostasomas) y los compararon con las actividades obtenidas en otros tejidos, limitando su estudio a los enzimas reguladores de los niveles encefalinérgicos, es decir, aminopeptidasas sensible e insensible a puromicina y endopeptidasa neutra.

Describieron por vez primera los niveles de NEP en prostasomas, y observaron que, en general, las mayores actividades se presentaban a este nivel. Dado que estas vesículas han sido implicadas en diversas funciones fisiológicas reproductivas, como la movilidad espermática, licuefacción del semen e inmunosupresión, propusieron que estas peptidasas podrían estar directamente implicadas en estos procesos. Teniendo en cuenta que nosotros apreciamos actividad también a nivel espermático, no es descartable una importante funcionalidad de estos enzimas en procesos como la movilidad espermática y la propia fertilización. Estos aspectos los discutiremos más adelante en este mismo apartado, ya que, debido a su ubicación específica, no es extraño encontrar bajos niveles de NEP en las muestras analizadas en el presente estudio.

Cualitativamente hablando, estudios realizados en nuestro laboratorio (Valdivia, 2004) demostraron que, en muestras normozoospermicas, los mayores niveles de actividad peptidásica correspondían a la APN, seguida de la dipeptidil peptidasa IV y, a cierta distancia, el resto de enzimas ensayados.

Nuestros resultados en muestras astenozoospermicas encuentran que, a nivel espermático, y contrariamente a lo que ocurre en semen normozoospermico, los mayores niveles de actividad corresponden a la dipeptidil peptidasa IV, seguida de la Aminopeptidasa neutra. La Prolil aminopeptidasa y la aminopeptidasa básica muestran niveles similares entre sí, y parecidos a la pGlu-AP, pero en todos los casos unas 10 veces inferiores a los primeros

descritos. La aminopeptidasa ácida presenta valores ligeramente inferiores a las cuatro anteriores, mostrando la endopeptidasa neutra valores mínimos de actividad.

De todos los péptidos controlados por peptidasas, ha sido posiblemente el grupo de los opioides endógenos, los más ensayados en relación con la fertilidad humana, tanto masculina como femenina.

Concretamente, estos péptidos se encuentran ampliamente expresados en distintos órganos del aparato reproductor masculino, como el epidídimo, la próstata, vesículas seminales y testículos (Fabbri y cols., 1988; Zhou y cols., 1990), aunque su papel en la reproducción masculina no es bien conocido y, en muchos aspectos controvertido. Pero sí está claro que estos péptidos juegan un papel en la reproducción humana ya que ha sido ampliamente descrita una disminución general de la motilidad espermática (astenozoospermia) en personas adictas a opiáceos (Ragni 1988), habiéndose propuesto un posible papel en la espermatogénesis (Kew 1990) pero desconociéndose su efecto sobre la funcionalidad espermática.

El efecto de los péptidos es regulado por su hidrólisis enzimática. La corta cadena que presentan los péptidos opioides endógenos es especialmente susceptible a la acción de las peptidasas, por lo que el estudio de los enzimas degradadores de encefalinas en muestras seminales podría permitir conocer la implicación de estos péptidos en el proceso reproductivo.

Sabemos que las encefalinas son inactivadas por acción hidrolítica de enzimas específicos, siendo dos las vías más importantes de inactivación:

- 1) la hidrólisis de la unión Gly-Phe, mediante la encefalinasa o endopeptidasa 24.11 (endopeptidasa neutra o NEP)
- 2) El desdoblamiento de la unión Tyr-Gly mediante aminopeptidasas, concretamente la aminopeptidasa neutra (EC 3.4.11.2) o APN.

El semen humano es un fluido constituido por la secreción de diferentes glándulas genitales. Además de los espermatozoides y varios constituyentes solubles, el semen presenta pequeñas estructuras corpusculares denominadas prostasomas (debido a su origen prostático). Estos prostasomas son vesículas membranosas que contienen grandes cantidades de colesterol, esfingomielina, calcio y proteínas, de las cuales, varias son enzimas. Han sido implicados en varias funciones fisiológicas como la mejora de la motilidad

espermática (Arienti y cols., 1997)), la licuefacción del semen (Utleg y cols., 2003) y la inmunosupresión. (Burden y cols., 2006)

Trabajos recientes (Subirán y cols., 2008; Aguirregoitia y cols., 2006; Valdivia y cols., 2004; Fernández y cols., 2002) han encontrado una alta actividad peptidásica en semen normozoospermico, siendo la fracción de los prostasomas la más activa. Sin embargo, la distribución de ambas enzimas no es homogénea en las diversas fracciones seminales ensayadas. Así, la NEP se presenta fundamentalmente en prostasomas, mientras que la APN es más espermática. Ambas enzimas son abundantes en liquido seminal, siendo en todos los casos la actividad enzimática muy superior a la existente en otros tejidos (por ejemplo, 10-20 veces superior a la encontrada en cerebro).

De hecho, los estudios de Fernández (2002) no mostraron actividad NEP en espermatozoide normozoospermico. Sin embargo, nuestros resultados en muestras astenozoospermicas muestran ambas actividades, APN y NEP, si bien es cierto que los niveles de NEP en espermatozoide son muy bajos. Podríamos entonces pensar que quizás esta actividad seria un artefacto sin actividad real en el esperma. Sin embargo, estudios recientes (Subirán y cols., 2008) han demostrado que una pequeña proporción de los espermatozoides normozoospermicos ensayados presentaban inmunotinción para NEP en el cuello de los mismos. Aun así, los resultados son muy contradictorios ya que, en conjunto, no se ha observado inmunorreactividad NEP por Western blot, pero como hemos dicho, estudios de inmunofluorescencia mostraron tinción intensa en el cuello pero de unos pocos espermatozoides, y el ARN mensajero para la NEP fue detectado por PCR en tiempo real.

Por tanto, la baja actividad de endopeptidasa neutra descrita en espermatozoides astenozoospermicos no es un artefacto sino que se trata de una actividad enzimática con una acción restringida a este nivel y muy localizada en la estructura del mismo. Además, los bajos niveles obtenidos en el conjunto pueden ser perfectamente el reflejo de su presencia en solo unos pocos espermatozoides. En este sentido, podríamos estar de acuerdo con Subirán en el hecho de que la escasa presencia de inmunorreactividad NEP, podría ser el resultado de los diferentes estados funcionales que sufren las membranas espermáticas durante la reorganización en la capacitación (Flesch y Gazella, 2000). En cualquier caso, parece claro que la función más importante de este enzima no se encuentra a nivel espermático, sino a nivel prostasómico.

La Aminopeptidasa neutra (APN) presenta altos niveles de actividad en los espermatozoides, tanto normos como astenozoospermicos, si bien, como hemos comentado, los niveles de actividad son menores en astenozoospermicos. Esta enzima regula la

actividad de las encefalinas y se han descrito elevadas concentraciones de este péptido tanto en semen como en célula espermática. Los opioides ejercen su función mediante su unión a receptores específicos de membrana, y hasta el momento se han descrito tres tipos de receptores de opioides ( $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ ) en espermatozoides humanos (Aguirregoitia y cols., 2006).

Aunque el efecto directo de los péptidos opioides en espermatozoides no es todavía comprendido y, de hecho, es incluso objeto de controversia, nuestros resultados podrían arrojar alguna luz sobre el tema.

El sistema opioide interviene claramente en la motilidad espermática, pero existen estudios contradictorios para explicar en que sentido lo hace, ya que algunos proponen que aumentan la movilidad y otros proponen lo contrario (Irazusta y cols., 2004; Fraioli, 1984; Foresta, 1986; Fusijawa, 1996). Se ha llegado a sugerir, para explicar la controversia, que estos diferentes efectos podrían ser causados por la activación de distintos receptores.

Conocemos que una alteración común en los adictos a opiáceos (drogas) es una clara reducción de la motilidad espermática (astenozoospermia). Es decir, altos niveles de opioides estarían directamente relacionados con una disminución en el grado de movilidad. Nuestros resultados muestran altos niveles de APN en espermatozoide, pero claramente inferiores a los observados en muestras normozoospermicas. Es decir, en este caso, una menor degradación de encefalinas (por unos niveles enzimáticos mas reducidos) conllevaría mayores niveles de opioides endógenos, todo ello relacionado a su vez con un descenso en la movilidad ya que, recordemos, nuestros resultados han sido obtenidos de muestras astenozoospermicas.

Por tanto, los resultados presentados en la presenta Tesis doctoral, parecen corroborar el hecho de que altos niveles de opioides en semen humano están directamente relacionados con un descenso en la motilidad espermática, lo que es coincidente con los resultados de Irazusta y cols. (2004), Fraioli (1984) y Foresta (1986), pero son contrarios a los obtenidos por Fusijawa (1996). Lo que no es todavía cuantificable es que niveles pueden considerarse altos/bajos.

Las muestras estudiadas provienen de sémenes astenozoospermicos (recuento numérico dentro de la normalidad y movilidad disminuida). La muestra final obtenida y estudiada dependerá de la proporción de espermatozoides móviles en la muestra original. Es decir, a menor movilidad, menor número de espermatozoides recuperados Estos espermatozoides representan las



células más activas y/o de más calidad fertilizante final, entendida como la capacidad para fecundar el ovocito. En nuestros resultados hemos observado una relación inversa entre la actividad de la APN y el número de espermatozoides recuperados. Recuperaciones  $\leq$  de 6 millones, se asocian a una mayor actividad enzimática que cuando el recuento es superior a 6 millones (748 UPA vs 446 UPA). Es decir, parece apreciarse que cuanto mayores son los niveles encefalinérgicos (menor degradación = niveles bajos de actividad enzimática), mayor es el número de espermatozoides activos y, viceversa, a menores niveles encefalinérgicos (mayor actividad degradativa) menor número de células espermáticas.

Se ha descrito que la necrozoospermia podría estar asociada a altas actividades de aminopeptidasa N. La relación de la actividad de este enzima con la muerte celular ha sido también descrita en otros tejidos. Así por ejemplo, se ha observado que, a nivel cerebral, la administración de inhibidores específicos de la aminopeptidasa protege de la muerte celular (Shishido 1999). Otro caso: Las células T de ratón que presentan alta actividad de prolil-endopeptidasa son altamente susceptibles de inducir muerte celular (Okada 2002). Con todo, no resulta claro si la alta actividad aminopeptidásica asociada a la necrozoospermia representa una causa o una consecuencia de la muerte celular. Lo que sí se puede apreciar con nuestros resultados es que altos niveles de actividad peptidásica están directamente relacionados con bajos niveles de espermatozoides activos recuperados, y que se ha descrito que tanto las encefalinas como otros péptidos opioides pueden proteger a las células de la necrosis y apoptosis (Hayashi 2002).

La función de la dipeptidil peptidasa IV en la fertilidad masculina es controvertida. Así, se ha encontrado actividad DPP en testículos y epidídimos de algunos mamíferos como bovinos y ratas, siendo esta actividad causada por DPP 4 en el epidídimo, mientras que en los testículos es atribuida a DPP8/9. Pero, curiosamente, no se ha encontrado actividad DPP en los espermatozoides a excepción de los incrustados en el epitelio, justo antes de su liberación a la luz y en las espermáticas que presentaban una tinción específica para DPP9 (Dubois y cols., 2009). Estos resultados son contradictorios tanto con los obtenidos en el presente trabajo de investigación como con resultados previos en muestras normozoospermicas (Valdivia, 2004).

Nuestros resultados muestran no solo presencia de actividad, sino que esta es la más alta de las observadas en muestras astenozoospermicas, lo que sugiere un importante papel de este enzima a nivel reproductivo y, posiblemente, relacionado directamente

con la motilidad espermática. Recordemos que en semen normozoospermico, los mayores niveles de actividad estudiada lo muestra la APN (a nivel espermático) por delante de la DPPIV, invirtiéndose esta situación en semen astenozoospermico, lo que indicaría que incrementos en esta actividad podrían asociarse a disminución en la motilidad espermática.

Se ha descrito que la DPPIV es un enzima que regula niveles de: GLP-1 (Glucagon-like peptide 1), GIP (péptido insulino-trófico dependiente de glucosa), péptidos biológicos que contengan prolina (o alanina), quemoquinas, factores de crecimiento, neuropéptidos, péptidos vasoactivos (neuropéptido Y, péptido YY), sustancia P y péptidos asociados con la taquicinina.

De los péptidos antecitados, los más estudiados desde un punto de vista de fertilización han sido la sustancia P y las taquicininas. Las taquicininas han sido localizadas en las fibras nerviosas de los testículos, en células de Leydig de diferentes especies animales, y también en las células de Sertoli de los testículos del hámster siberiano. Las taquicininas inhiben la liberación de testosterona en los testículos o en fragmentos aislados de células de Leydig *in Vitro*. Estimulan la liberación de lactato y transferrina y la actividad de la aromatasa en células de Sertoli *in Vitro*. Ambas líneas celulares expresan el gen Preprotaquicinina, y este hecho sugiere que las taquicininas se pueden sintetizar en los testículos. Estos hallazgos sugieren que estas sustancias pueden tener una función fisiológica en los testículos como moduladores de las funciones de los diferentes tipos de células contenidas en estos órganos (Debeljuk y cols, 2003).

La presencia de la sustancia P (SP) ha sido demostrada en el eyaculado humano y en el plasma seminal (Debeljuk y cols., 2003; Sastry y cols., 1991). Sastry y cols. informaron en este sentido que la SP causa efectos tanto de inhibición como de estimulación sobre la motilidad del espermatozoides humano.

Recientemente se ha demostrado que las taquicininas causan incremento dosis- dependiente en la proporción de espermatozoides de movilidad progresiva, produciendo una disminución paralela del porcentaje de espermatozoides móviles no progresivos en muestras seminales incubadas con taquicininas. Estos efectos se mantenían durante varias horas y dependían de la motilidad inicial y fueron más pronunciados cuando menor fue la movilidad inicial, siendo el péptido SP la taquiquicina mas activa, en términos de potencia y efecto máximo.

Se ha demostrado la presencia de taquicininas en los espermatozoides humanos, así como sus receptores (NK1, NK2, NK3) localizados en el acrosoma, pieza intermedia y flagelo del espermatozoide. Estos datos apoyan la noción de que las taquicininas podrían actuar como moléculas de señalización intercelular y de estar implicadas en los procesos de reproducción y fertilización (Ravina y cols., 2007; Pinto y cols., 2010).

Con los resultados aquí obtenidos se apreciaría una doble situación que es lo que podría afectar directamente a la motilidad espermática: por un lado, bajos niveles de APN se correlacionarían con altos niveles de encefalinas, y altos niveles de DPPIV con bajos niveles (por aumento en su degradación) de taquicininas y sustancia P, lo que en su conjunto podría disminuir la motilidad espermática.

El resto de los enzimas ensayados presenta, en general, actividades muy inferiores a las anteriormente mencionadas. Así, los niveles obtenidos para la POP, APB, pGlu-API y APA, son similares entre ellos, pero del orden de 10 veces inferiores a los observados para la APN y DPPIV. Hay pocos estudios previos sobre la presencia e implicación de estas enzimas en el tracto reproductor masculino tanto en humanos como en animales de experimentación.

Así, la expresión de Prolil oligopeptidasa (POP) en testículo de ratón es máxima a los 2 semanas de vida, reduciéndose gradualmente a partir de entonces. Las señales positivas se detectaron en todos los tipos de células en los túbulos seminíferos antes de la maduración, y se limitaron a espermátidas en el ciclo de la espermatogénesis en estadios I-VIII en ratones adultos.

La POP se detectó en la fracción insoluble de los espermatozoides. Análisis inmunohistoquímicos demostraron que esta localizada en las espermátidas en los pasos 12-16 de espermiogénesis y en la pieza intermedia del flagelo. También se encontró que los inhibidores específicos de POP (poststatin y benzyloxycarbonyl-proline-prolinal), suprimen la motilidad espermática. Kimura (2002) sugiere que la POP puede estar involucrada en la meiosis de los espermátocitos, la diferenciación de las espermátidas, y motilidad de los espermatozoides en el ratón.

Dados los niveles de actividad encontrados en el presente estudio, parece efectivamente deducirse la importancia que esta actividad puede tener en la motilidad espermática, dada la ubicación de la misma (pieza intermedia del flagelo) y del hecho de que su actividad es muy inferior a la de NEP.

El siguiente enzima en actividad es la aminopeptidasa básica. Ha sido purificado en extractos homogeneizados de testículo de rata. Presenta un 33% de identidad y un 48% de similitud con el leucotrieno-A4 hidrolasa, una relación reforzada por la capacidad de APB para hidrolizar leucotrieno A4. AP-B y su ARNm se detectaron en la línea germinal y en las células de Sertoli y peritubulares de los túbulos seminíferos. Mediante inmunohistoquímica, la aminopeptidasa-B resultó ser particularmente abundante en los túbulos seminíferos en las últimas etapas de la espermatogénesis y fue claramente detectado en una zona restringida de espermátidas alargadas, concentrándose masivamente en los cuerpos residuales. Debido a que la enzima se encontró en el medio conteniendo espermatoцитos y espermátidas y en el acrosoma durante la formación de los espermatozoides, sugieren una implicación de esta exometalopeptidasa en los mecanismos de procesamiento de proproteínas y propéptidos en el curso de la diferenciación espermática (Cadel, 1997). A pesar de esta ubicación, y habida cuenta de los niveles apreciados en este trabajo, no se puede descartar un papel de la APB en el espermatozoide maduro, posiblemente también relacionado con mecanismos de procesamiento de péptidos regulados por este enzima.

La presencia de piroglutamil peptidasa I ha sido previamente referida en diversos fluidos de secreción como el semen humano (O'Cuinn y cols., 1990), habiéndose observado en todas las fracciones del líquido seminal, presentando una mayor actividad en la fracción de espermatozoides, si bien los estudios previos abarcan solo esperma normo y necrozoospermico. En este sentido, esta actividad era mayor en semen con necrozoospermia que en semen con normozoospermia. Aunque resultan difíciles de comparar, parece que los niveles obtenidos en muestras astenozoospermicas son superiores a los observados en muestras normozoospermicas, lo que podría resultar coincidente con resultados previos y apoyar la hipótesis de que este enzima pudiera participar en la regulación de los niveles de los análogos de TRH seminales y en la mediación de la muerte asociada con el esperma necrozoospermico (Valdivia y cols., 2004).

La principal función bioquímica de la Aminopeptidasa A es convertir la angiotensina II en angiotensina III, rompiendo el N-terminal de aminoácidos ácidos (aspartato), sirviendo como paso limitante en el metabolismo de la Angiotensina II. Por ello, el principal papel atribuido a la APA es el de regular el sistema renina-angiotensina intrarrenal, habiendo sido descrita en la superficie de las

células endoteliales glomerulares, mesangiales y podocitos a lo largo de la nefrona, teniendo la más alta expresión en el túbulo proximal renal. Además, la Aminopeptidasa A es uno de los péptidos efectores principales del sistema renina-angiotensina cerebral, ejerciendo un efecto tónico estimulante sobre el control de la presión arterial, habiéndose establecido líneas de investigación, en busca de fármacos antihipertensivos por bloqueo de esta aminopeptidasa (Bodineau y cols., 2008).

Sin embargo, se han encontrado también componentes del RAS en los testículos, epidídimo, conductos deferentes, próstata y semen. Las funciones del RAS en los procesos locales en estos sitios, son todavía inciertos y aún no se han dilucidado totalmente, aunque hay pruebas de la participación en la contractilidad tubular, la espermatogénesis, la maduración de espermatozoides, la capacitación, la exocitosis acrosomal y la fertilización (Leung y Sernia, 2003). Los niveles de actividad espermática obtenidos en el presente trabajo, parecen en cualquier caso corroborar el papel del RAS en la fertilización.

De todo lo anterior, se deduce que, tanto los péptidos bioactivos como las peptidasas que los regulan, estarían implicados directamente en la fertilidad, pudiendo suponer que lo estarían regulando tanto la motilidad espermática como los procesos de, espermatogénesis, maduración de espermatozoides y la capacitación.

## **2.2. Sobre las modificaciones metabólicas en el tiempo.**

Como hemos comentado en la Introducción, se define clínicamente la esterilidad como "la incapacidad de concebir después de al menos 1 año sin protección de coito". Se estima que afecta al 10% de las parejas en edad reproductiva, pero en los últimos años se ha producido un aumento de su incidencia, debido a la aparición de una esterilidad de causa social, que retrasa el deseo gestacional hacia edades que implican un declive natural de la fertilidad, alcanzando el problema al 15% de la población.

Actualmente la Inseminación Intrauterina es el tratamiento de elección en esterilidades por factor masculino leve, disovulación y por causa desconocida. Es una técnica barata, poco invasiva, y con un alto grado de eficacia en los casos indicados. El tratamiento de IIU conlleva una serie de procesos en los que el factor tiempo aplicado al

procesamiento seminal, puede ser un factor pronóstico fundamental desde un punto de vista de mejora de resultados. Estos procesos incluyen: la recogida seminal, el proceso de lavado espermático ("sperm wash"), la capacitación espermática y la propia IUI.

Se desconoce durante cuanto tiempo mantienen el ovocito y el espermatozoide humanos la capacidad de fertilizar o ser fertilizado, aunque se estima entre 12-24 horas para el ovocito y 48-72 horas para el espermatozoide. Sin embargo, la WHO (the World Health Organization) recomienda que el tratamiento seminal debiera producirse como máximo entre 30 minutos y una hora tras obtención del mismo.

La muestra de semen se recoge, excepto en casos especiales, por masturbación, tras un período de abstinencia sexual no inferior a 2 días (dado que puede disminuir el recuento espermático), ni superior a 7, en un frasco estéril, teniendo un especial cuidado en que no se derrame parte de la misma y se recoja todo el eyaculado, dado que la primera porción contiene la mayor cantidad de esperma. Tanto el análisis espermático como el tratamiento previo de las muestras, debería producirse antes de una hora desde la obtención. Por ello, se recomienda (WHO) que la recogida de muestra se lleve a cabo en un lugar privado pero cercano al laboratorio.

Sin embargo, la mayoría de los pacientes prefiere una obtención mas privada en el domicilio, por lo que, en el presente estudio, las muestras se obtuvieron en el domicilio o bien en la Unidad de Reproducción, cuando la distancia geográfica fuera excesiva y condicionara un intervalo de tiempo superior a una hora desde la obtención hasta la entrega. Antes del procesamiento la muestra se mantiene a temperatura ambiente (20 °C-22 C °) hasta su total licuefacción y no debe pasar más de una hora desde su obtención hasta su procesamiento. El factor tiempo en relación con la recogida de muestra y comienzo del tratamiento es un aspecto muy controlado, pero desgraciadamente, no siempre se produce la entrega en los límites horarios establecidos.

La muestra seminal se procesa en el laboratorio. Su objetivo es eliminar el plasma seminal, que posee acciones decapacitantes, así como leucocitos, bacterias y los espermatozoides muertos que al producir radicales de oxígeno (ROS), influyen negativamente en la capacidad de fertilizar el óvulo. Las dos técnicas mas empleadas son: el "swin-up" que permite recuperar los mejores espermatozoides mediante migración al sobrenadante, y el método de gradientes,

(SupraSperm, Origio Medicult Media, Jyllinge, Dinamarca), donde se obliga a los espermatozoides a atravesar varios gradientes de distinta densidad, obteniendo los espermatozoides del pellet de más densidad. Ambas técnicas obtienen resultados clínicos similares al utilizarse en TRA, aunque la concentración de espermatozoides móviles progresivos es mayor con la técnica de gradientes, ya que ambos métodos permiten la obtención de una población de espermatozoides con un bajo porcentaje de apoptosis. Por ello, es la técnica de Gradientes de Densidad la que empleamos habitualmente en nuestro programa de Inseminaciones Intrauterinas. Nos permite una mejor recuperación de espermatozoides móviles, sobre todo en las muestras con baja concentración espermática ó de movilidad. La duración del procesamiento seminal es el mismo, en todas las muestras.

Una vez obtenidos los espermatozoides hiperactivos, se procede al tratamiento de IIU. A pesar de que se recomienda un tratamiento inmediato tras capacitación (Mortimer, 1994), lo cierto es que los espermatozoides pueden sobrevivir 24 horas en el medio de cultivo, cuya composición es similar al fluido tubarico (Quin y cols., 1985). Sin embargo, un ensayo reciente (Yavas y Selub, 2004) presentó un trabajo epidemiológico en el que se planteaba la relación directa que podía existir entre el tiempo transcurrido entre la obtención de la muestra de semen y la inseminación tras la capacitación seminal y la tasa de embarazo obtenidas. En dicho estudio concluyeron que retrasar el tratamiento del semen de 30 minutos hasta 1 hora y / o retrasar la IIU de 90 minutos hasta 2 horas después de la recolección compromete el resultado del embarazo en la ciclos de IIU, por lo que las muestras de semen deben ser tratados tan pronto como se pueda, después de la licuefacción y en los 30 minutos de la obtención, y la IIU debe realizarse tan pronto como se termine la preparación seminal (capacitación) y como máximo a los 90 minutos de la eyaculación. En su estudio, observaron un 48% de embarazos, si la muestra se procesaba dentro de los 30 minutos de la obtención, frente al 18% si la capacitación se iniciaba de 31-60 minutos después ( $p=0.02$ ). Así mismo las tasas de embarazo disminuían si el intervalo de tiempo desde la obtención hasta la inseminación era de 90 minutos (99%), 91-120minutos (22%) o > 120 minutos (7%) ( $p<0.0001$ ).

Por ello, en el presente trabajo realizamos por un lado, un seguimiento clínico entre la obtención de la muestra, capacitación, el tiempo transcurrido hasta la IIU y la tasa de embarazo obtenida, y por otro, un estudio metabólico en el que ensayamos las posibles modificaciones temporales que aparecían en el metabolismo peptídico tras la capacitación espermática. Los resultados clínicos los

presentamos en apartado diferente (ver apartado 1 de la discusión), así como la discusión conjunta de ambos apartados.

Nos planeamos realizar un seguimiento de la actividad metabólica peptidérgica a lo largo del tiempo, es decir, a diferentes tiempos post-capacitación. El intervalo temporal planteado fue de una hora hasta empezar a obtener las primeras modificaciones significativas, que conllevarían cambios en la regulación peptidérgica. Como hemos presentado en el apartado de material y métodos, los tiempos ensayados fueron: 0 y 1, 2, 3 y 4 horas postcapacitación, momento en que comenzamos a observar alteraciones significativas en algunos de los enzimas.

Tomando como referencia la determinación postcapacitación, es decir, el considerado tiempo 0, no obtuvimos diferencias significativas de actividad en ninguno de los enzimas ensayados ni a la primera, segunda ni tercera hora tras capacitación espermática.

Sin embargo, y aunque los cambios no se produjeron en todos los enzimas, a la cuarta hora empezaron a apreciarse diferencias significativas en relación con las determinaciones temporales anteriores. Estos resultados parecen indicar que, al menos desde un punto de vista metabólico, no hay alteraciones significativas hasta la tercera hora después de la capacitación, lo que podría indicar que en este espacio temporal (hasta tres horas) se podrían mantener los niveles de capacidad fertilizante de los espermatozoides, resultados que no son coincidentes con los obtenidos por Yavas y Selub en 2004, pero se aproximan más a las indicaciones de la WHO, que plantean una capacidad y una supervivencia espermática mayor.

Una de las posibles explicaciones a las modificaciones observadas a las cuatro horas podría ser directamente que se empieza a producir apoptosis celular. Sin embargo, no descartando en absoluto esta posibilidad, cabría hacerse alguna reflexión al respecto, ya que las alteraciones observadas no parecen ser homogéneas en todos los enzimas, lo que podría quizá indicar un proceso adaptativo del espermatozoide para mantener su capacidad fertilizante.

Así, no se observan modificaciones significativas en la Pro-aminopeptidasa, NEP y APN, si bien, en este último caso, se observa un incremento no significativo a la cuarta hora postcapacitación. Esto podría indicar una posible mayor degradación encefalinérgica en ese momento, lo que contribuiría a un descenso en los niveles peptídicos que, como hemos indicado, favorecería una mejor movilidad espermática (Subirán y cols., 2008; Sastry, 1991).



Tampoco se observan alteraciones significativas en la pGlu-aminopeptidasa si bien, a la cuarta hora, se aprecia un descenso no significativo en esta actividad proteolítica. Aunque, como hemos presentado anteriormente, resultan difíciles de comparar, parece que los niveles obtenidos en muestras astenozoospermicas son superiores a los observados en muestras normozoospermicas, lo que resultaría coincidente con resultados previos y apoyaría la hipótesis de que este enzima pudiera participar en la regulación de los niveles de los análogos de TRH seminales y en la mediación de la muerte asociada con el espermatozoide necrozoospermico (Valdivia y cols., 2004). El descenso en la actividad enzimática observada a la cuarta hora podría nuevamente tratarse de una adaptación espermática, disminuyendo el nivel degradativo de la TRH y análogos, lo que conllevaría una mayor capacidad fertilizante del espermatozoide.

Contrariamente a los casos anteriores, tanto la DPPIV, como las APB y APA, muestran incrementos significativos de actividad a la cuarta hora postcapacitación. Resulta interesante constatar que, a pesar de tratarse de actividades enzimáticas diferentes, todas ellas controlan, en mayor o menor grado los mismos o similares péptidos: Taquicinas y sustancia P, angiotensinas e, incluso, opioides. Todos estos péptidos han sido, de una u otra forma, relacionados con la motilidad espermática (Pinto y cols., 2010; Fraser 2001; Fraioli, 1982), si bien los diferentes estudios realizados hasta el momento no aclaran el posible papel de cada uno de ellos en dicha movilidad ya que, incluso, se ha observado que por ejemplo, tanto los opioides como las taquicinas pueden producir las dos situaciones: incrementos y descensos en la movilidad, por lo que los resultados aquí obtenidos no pueden, desgraciadamente, resultar concluyentes.

### 3. INTEGRACIÓN DE RESULTADOS.

Como hemos podido apreciar al ir desarrollando la discusión de los resultados, se dan varias circunstancias que reflejan la importancia que cada uno de los enzimas ensayados podría tener sobre la fertilidad espermática, confirmándose, en general, la importancia del sistema opioide en dicho proceso ya que los mayores niveles enzimáticos los presentan precisamente las proteínas implicadas en el control metabólico encefalinérgico, así como en la DPPIV. Recordemos que el muestras normozoospermicas es, efectivamente la APN el enzima que muestra mayor actividad, seguida de la DPPIV, pero ésta situación se invierte en semen astenozoospermico (Valdivia, 2004).

Al estudiar las posibles modificaciones que, con el tiempo postcapacitación, se observan en las distintas proteínas ensayadas, parece desprenderse que no hay una alteración metabólica clara durante las tres primeras horas, apareciendo las alteraciones a partir de la cuarta hora. De esto podría deducirse que los primeros momentos tras la capacitación, serían adecuados para llevar a cabo el proceso fertilizante. En nuestro caso, las inseminaciones fueron realizadas durante la primera hora postcapacitación, no encontrando diferencias significativas para las tasas de embarazo/ciclo, en los intervalos de tiempo <20 min., <30 min., <40 min. y <60 min. Es posible, que la capacidad fertilizante del semen dependiente de este grupo enzimático, se mantenga, a la vista de la escasa variación de su actividad, durante las primeras tres horas tras la capacitación

Sin embargo cuando el tiempo invertido entre la obtención y la inseminación fue superior a 150 minutos la tasa de embarazo/ciclo se redujo a la tercera parte (11% vs. 35%). Este límite de tiempo no coincide con el referido por Yavas, que lo establece en 120 minutos. Pero si coincidimos, al encontrar una ausencia de embarazos, cuando se superan las tres horas entre la obtención y la Inseminación.

Quizá el problema radique en el intervalo de tiempo entre la obtención y su prepararon. Cuando observamos la tasa de embarazo por ciclo, en función de este intervalo de tiempo, observamos que se produce una tasa de embarazo del 50% (<60 minutos), 30% (60-90 minutos) y del 16% si el tiempo es superior a los 90 minutos.

Si distribuimos las actividades enzimáticas en función del resultado clínico, apreciamos que la APN presenta menores niveles de actividad (a tiempo cero) en sémenes que consiguen fertilización frente a los que no lo consiguen ( $p < 0.05$ ). La actividad media enzimática en las muestras seminales utilizadas en pacientes que obtienen resultado positivo es de 300 UAP y, curiosamente, existe una relación directa entre el número de espermatozoides recuperados.

Es decir, mayor nivel espermático, mejor resultado en embarazos y menor actividad enzimática reguladora de encefalinas.

Concretamente, en nuestros resultados podemos observar como la actividad de APN esta directamente relacionada con dicho numero de espermatozoides activos recuperados y con la tasa de embarazo obtenido. Cuando el numero de células espermáticas es inferior a 6 millones/ml, los niveles medios de actividad enzimática son casi el doble (748UAP) que con cifras espermáticas superiores a 6 millones (446 UAP). Es decir, parece apreciarse que cuanto mayores son los niveles encefalinérgicos (menor degradación = niveles bajos de actividad enzimática), mayor es el numero de espermatozoides activos y, viceversa, a menores niveles encefalinérgicos (mayor actividad degradativa) menor numero de células espermáticas. Además, la mayor tasa de embarazos se observa en muestras procesadas en la primera hora tras su obtención.

Como ya hemos presentado anteriormente, no estamos hablando de movilidad, sino de número de espermatozoides activos. Como ya hemos descrito, la necrozoospermia podría estar asociada a altas actividades de aminopeptidasa N. No resulta claro si la alta actividad aminopeptidásica asociada a la necrozoospermia representa una causa o una consecuencia de la muerte celular. Si embargo, clínicamente conocemos que las muestras seminales, van perdiendo movilidad y numero de espermatozoides vivos, según transcurre el tiempo desde su obtención, por lo que se han establecido limites horarios para un correcto diagnostico seminal (< de dos horas) (WHO). Lo que sí se puede apreciar con nuestros resultados es que altos niveles de actividad peptidásica están directamente relacionados con baja tasa de embarazo y bajo recuento de espermatozoides, que a su vez se observa en muestras procesadas en un tiempo superior a los 90 minutos. Por lo que es probable, que las encefalinas y otros péptidos opioides pueden proteger a las células de la necrosis y apoptosis (Hayashi, 2002).

La variabilidad de la actividad enzimática de la APN en el tiempo es estable, hasta la cuarta hora, en que se produce un aumento de su actividad. Este patrón se mantiene tanto en las muestras que embarazan, como en las no fértiles, siguiendo un modelo paralelo en sus valores

Las recomendaciones de Yavas, parecen confirmarse en este estudio, donde se aprecian variaciones de resultados clínicos y enzimáticos en función del tiempo desde la obtención y la

inseminación. Sin embargo nuestro intervalo de tiempo "crítico" es de 150 minutos, en lugar de los 120 minutos referidos por él.

No encontramos diferencias significativas en el resto de los enzimas estudiados, cuando analizamos su actividad en tiempo "0" entre el grupo de embarazos y no embarazos, aunque hay menor actividad en la DPP IV, PRO y ASP y mayor actividad en la APB en las muestras que no embarazan. Los valores son similares para la NEP y la PGLU. Además observamos, de nuevo, una variación paralela de su actividad a lo largo de las cuatro horas, con la excepción de la DPP IV y la PRO, que la aumentan a la cuarta hora, en el grupo de embarazos.

En resumen, la presencia de todas estas actividades enzimáticas corrobora el papel que pueden tener todas ellas en la capacidad fertilizante de los espermatozoides, si bien los diferentes niveles de actividad obtenidos parecen demostrar tanto la diferente función como la posible importancia que los distintos enzimas podrían tener en la capacidad fertilizante espermática. La actividad enzimática real del espermatozoide, es desconocida. Recordemos que fisiológicamente, es inmediatamente después de la eyaculación cuando inicia su capacidad fertilizante, a través del paso directo al aparato genital femenino y que nuestras observaciones se basan en muestras que proceden de eyaculados de hasta más de 90 minutos.

Por otro lado, parece deducirse inicialmente que, al no apreciarse modificaciones significativas de actividad con el tiempo (hasta la cuarta hora), la capacidad fertilizante de los espermatozoides astenozoospermicos no se vería alterada al menos durante las primeras tres horas tras la capacitación. Sin embargo, parece que los primeros 90 minutos, desde la obtención seminal, son importantes para el metabolismo del espermatozoide, ya que transcurrido ese tiempo la tasa de embarazos se desploma. Las recomendaciones de Yavas, parecen confirmarse en este estudio, donde se aprecian variaciones de resultados clínicos y enzimáticos en función del tiempo desde la obtención y la inseminación. Sin embargo nuestro intervalo de tiempo "crítico" es de 150 minutos, en lugar de los 120 minutos referidos por él, siendo el intervalo más importante el transcurrido desde la obtención hasta el inicio de la capacitación.

Finalmente, las recomendaciones de Yavas, parecen confirmarse en este estudio, donde se aprecian variaciones de resultados clínicos y enzimáticos en función del tiempo desde la obtención y la Inseminación. Hemos encontrado una disminución en la actividad enzimática, en aquellas muestras procesadas antes de los 45 minutos desde su obtención en la APN, DPPIV, y PGLU. Estos valores se

incrementan según se alarga el tiempo desde la obtención, hasta la capacitación. Inversamente, la actividad era mayor para la PRO, NEP, APB y ASP. Curiosamente, es en este grupo de muestras, donde se obtiene la mayor tasa de embarazos (50%). Sin embargo nuestro intervalo de tiempo crítico es de 150 minutos, en lugar de los 120 minutos referidos por él, siendo el tiempo transcurrido entre la obtención seminal y el comienzo de la capacitación, determinante para la consecución del embarazo (< de 45 minutos) asociándose a una variación de la actividad enzimática, en el tiempo 0.



## **V. CONCLUSIONES**





1) Se describen por vez primera en muestras astenozoospermicas (espermatozoide completo) la presencia de diversos enzimas proteolíticos: Aminopeptidasa N, Endopeptidasa Neutra, Prolil Endopeptidasa, Piroglutamil Peptidasa, Dipeptidil Peptidasa IV, Aminopeptidasa B y Aminopeptidasa A.

2) A diferencia de lo descrito previamente para muestras normozoospermicas, los mayores niveles de actividad aparecen en la DPPIV, seguida de la aminopeptidasa neutra. Los niveles enzimáticos del resto de proteínas ensayadas son significativamente inferiores a las anteriores.

3) Los bajos niveles de NEP detectados parecen corroborar una presencia enzimática con una acción restringida a nivel de cuello espermático muy localizada en la estructura del mismo. Además, los bajos niveles obtenidos en el conjunto pueden ser perfectamente el reflejo de su presencia en solo unos pocos espermatozoides.

4) Los resultados obtenidos al ensayar los niveles de encefalinasas parecen corroborar el hecho de que altos niveles de opioides en semen humano están directamente relacionados con un descenso en la motilidad espermática.

5) Tomando como referencia la determinación postcapitación, es decir, el considerado tiempo 0, no obtuvimos diferencias significativas de actividad en ninguno de los enzimas ensayados ni a la primera, segunda ni tercera hora tras capacitación espermática. Sin embargo, y aunque los cambios no se produjeron en todos los enzimas, a la cuarta hora empezaron a apreciarse diferencias significativas en relación con las determinaciones temporales anteriores. Estos resultados parecen indicar que, al menos desde un punto de vista metabólico, no hay alteraciones significativas hasta la tercera hora después de la capacitación, lo que podría indicar que en este espacio temporal (hasta tres horas) se podrían mantener los niveles de capacidad fertilizante de los espermatozoides.

6) Cuando el tiempo invertido entre la obtención y la inseminación fue superior a 150 minutos la tasa de embarazo/ciclo se redujo a la tercera parte (11% vs. 35%). Este límite de tiempo no coincide con el referido por otros autores, que lo establece en 120 minutos. Pero si coincidimos, al encontrar una ausencia de embarazos, cuando se superan las tres horas entre la obtención y la Inseminación.

7) Si distribuimos las actividades enzimáticas en función del resultado clínico, apreciamos que la APN presenta menores niveles de actividad (a tiempo cero) en sémenes que consiguen fertilización frente a los que no lo consiguen ( $p < 0.05$ ). La actividad media enzimática en las muestras seminales utilizadas en pacientes que obtienen resultado positivo es de 300 UAP y existe una relación directa entre el número de espermatozoides recuperados. Es decir, mayor nivel espermático, mejor resultado en embarazos y menor actividad enzimática reguladora de encefalinas.

8) Cuando el número de células espermáticas es inferior a 6 millones/ml, los niveles medios de actividad enzimática son casi el doble (748UAP) que con cifras espermáticas superiores a 6 millones (446 UAP). Es decir, parece apreciarse que cuanto mayores son los niveles encefalinergicos (menor degradación = niveles bajos de actividad enzimática), mayor es el número de espermatozoides activos y, viceversa, a menores niveles encefalinergicos (mayor actividad degradativa) menor número de células espermáticas. Además, la mayor tasa de embarazos se observa en muestras procesadas en la primera hora tras su obtención.

9) Al no apreciarse modificaciones significativas de actividad con el tiempo (hasta la cuarta hora), la capacidad fertilizante de los espermatozoides astenozoospermicos no se vería alterada al menos durante las primeras tres horas tras la capacitación. Sin embargo, parece que los primeros 90 minutos, desde la obtención seminal, son importantes para el metabolismo del espermatozoide, ya que transcurrido ese tiempo la tasa de embarazos se desploma. Las recomendaciones anteriores a este trabajo parecen confirmarse en este estudio, donde se aprecian variaciones de resultados clínicos y enzimáticos en función del tiempo desde la obtención y la inseminación. Sin embargo nuestro intervalo de tiempo "crítico" es de 150 minutos, en lugar de los 120 minutos referidos anteriormente, siendo el intervalo más importante el transcurrido desde la obtención hasta el inicio de la capacitación.

10) Se observa una disminución en la actividad enzimática, en aquellas muestras procesadas antes de los 45 minutos desde su obtención en la APN, DPPIV, y PGLU. Estos valores se incrementan según se alarga el tiempo desde la obtención, hasta la capacitación. Inversamente, la actividad era mayor para la PRO, NEP, APB y ASP. Es en este grupo de muestras, donde se obtiene la mayor tasa de embarazos (50%). Sin embargo nuestro intervalo de tiempo crítico es

de 150 minutos, en lugar de los 120 minutos referidos por él, siendo el tiempo transcurrido entre la obtención seminal y el comienzo de la capacitación, determinante para la consecución del embarazo (< de 45 minutos) asociándose a una variación de la actividad enzimática, en el tiempo 0.



## **VI. BIBLIOGRAFÍA**

Abdallah ME, Yelian F, Diamond MP y Puscheck EE. Correlation of Processed Total Motile Sperm Count with Intrauterine Insemination Success *Fertil Steril* 2009 March; 91(3), Suppl 1: S10.

Abe K, Fukuda K, Tokui T. Marginal involvement of pyroglutamyl aminopeptidase I in metabolism of thyrotropin-releasing hormone in rat brain. *Biol Pharm Bull.* 2004 Aug; 27(8):1197-201.

Abe K, Fukuda K, Tokui T. Marginal involvement of pyroglutamyl aminopeptidase I in metabolism of thyrotropin-releasing hormone in rat brain. *Biol Pharm Bull.* 2004 Aug; 27(8):1197-201.

Adeoya-Osiguwa SA and Fraser LR Calcitonin acts as a first messenger to regulate adenylyl cyclase/cAMP and mammalian sperm function. *Mol Reprod Dev* 2003 Jun; 65(2):228-366.

Adeoya-Osiguwa SA and Fraser LR Capacitation state-dependent changes in adenosine receptors and their regulation of adenylyl cyclase/cAMP. *Mol Reprod Dev.* 2002 Oct; 63(2):245-55.

Agirregoitia E, Valdivia A, Carracedo A, Casis L, Gil J, Subiran N, Ochoa C, Irazusta J Expression and localization of delta-, kappa-, and mu-opioid receptors in human spermatozoa and implications for sperm motility. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Dec; 91(12):4969-75.

Agirregoitia N, Casis L, Gil J, Ruiz F, Irazusta J Ontogeny of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptidase I in rat tissues. *Regulatory Peptides*, 2007 Mar; 139(1-3):52-8.

Ahinko-Hakamaa K, Huhtala H, Tinkanen H. Success in intrauterine insemination: the role of etiology *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2007; 86(7):855-60.

Ahmad K, Bracho GE, Wolf DP, Tash JS. Regulation of human sperm motility and hyperactivation components by calcium, calmodulin, and protein phosphatases. *Arch Androl.* 1995 Nov-Dec; 35(3):187-208.

Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 1998 Nov; 59(5):1037-46.

Alba F, Arenas JC, Lopez MA. Comparison of soluble and membrane-bound pyroglutamyl peptidase I activities in rat brain tissues in the presence of detergents. *Neuropeptides.* 1995 Aug; 29(2):103-7.

Albrizio M, Guaricci AC, Maritato F, Sciorsci RL, Mari G, Calamita G, Lacalandra GM, Aiudi GG, Minoia R, Dell'Aquila ME, Minoia P. Expression and subcellular localization of the muopioid receptor in equine spermatozoa: evidence for its functional role. *Reproduction.* 2005 Jan; 129(1):39-49.

Alexander CJ, King J, Lipari C, Zhao Y and Wallach EE. The Effect of Time Intervals Between Semen Collection, Processing and Intrauterine Insemination (IUI) on Pregnancy Rates in Clomiphene-Citrate-IUI Cycles. *Fertil Steril Suppl* 2005 Sep 84(1): S279.

Allegra A, Marino A, Coffaro F, Scaglione P, Sammartano F, Rizza G, Volpes A. GnRH antagonist-induced inhibition of the premature LH surge increases pregnancy rates in IUI-stimulated cycles. A prospective randomized trial. *Hum Reprod.* 2007 Jan; 22(1):101-8.

Alvarez C, Castilla JA, Martínez L, Ramírez JP, Vergara F, Gaforio JJ. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Hum Reprod.* 2003 Oct; 18(10):2082-8.

Amann RP, Howard SS. Daily spermatozoal production and epididymal spermatozoal reserves on the human male. *J Urol* 1980; 124:211-215.

Ammini AC, Pandey J, Vijayaraghavan M, Sabherwal U. Human female phenotypic development: role of fetal ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994 Aug; 79(2):604-8

Amso NN, Crow J, Lewin J, Shaw RW. A comparative morphological and ultrastructural study of endometrial gland and fallopian tube epithelia at different stages of the menstrual cycle and the menopause. *Hum Reprod.* 1994 Dec; 9(12):2234-41.

Anastasi A, Erspamer V, Bucci M. Isolation and structure of bombesin and alytesin. 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombina orientalis* and *Alytes obstetricans*. *Experientia* 1971 Feb; 27(2):166-7.

Angelisová P, Drbal K, Horejsí V, Cerný J. Association of CD10/neutral endopeptidase 24.11 with membrane microdomains rich in glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and Lyn kinase. *Blood.* 1999 Feb 15; 93(4):1437-9.

Antczak C, De Meester I, Bauvois B. Ectopeptidases in pathophysiology. *Bioessays.* 2001 Mar; 23(3):251-60.

Appell RA, Evans PR, Blandy JP. The effect of temperature on the motility and viability of sperm. *Br J Urol* 1977 Dec; 28(12):1329-32.

Arán B, Blanco J, Vidal F, Vendrell JM, Egozcue S, Barri PN, Egozcue J, Veiga A. Screening for abnormalities of chromosomes X, Y, and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program. *Fertil Steril.* 1999 Oct; 72(4): 696 -701.

Arienti G, Carlini E, Verdacchi R, Cosmi EV, Palmerini CA. Prostate to sperm transfer of CD13/aminopeptidase N (EC 3.4.11.2). *Biochim Biophys Acta.* 1997 Oct 20; 1336(3):533-8.

Arny M, Quagliarello J. Semen quality before and after processing by a swim-up method: relationship to outcome of intrauterine insemination. *Fertil Steril* 1987 Nov; 48:643-8

Aten RF, Williams AT, Behrman HR. Ovarian gonadotropin-releasing hormone-like protein(s): demonstration and characterization. *Endocrinology* 1986 Mar; 118(3):961-7.

Audhya T, Hollander CS, Schlesinger DH, Hutchinson B. Structural characterization and localization of corticotropin-releasing factor in testis. *Biochim Biophys Acta.* 1989 Mar 16; 995(1):10-6.

Azad N, Uddin S, La Paglia N, Kirsteins L, Emanuele NV, Lawrence AM and Kelley MR, Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in rat prostate: characterization of LHRH peptide, messenger ribonucleic acid expression, and molecular processing of LHRH in intact and castrated male rats, *Endocrinology* 1993 Sep;133(3):1252-7.

Azaryan A. V., Krieger T. J. and Hook V. Y. H. Purification and characteristics of the candidate prohormone processing proteases PC2 and PC1/3 from bovine adrenal medulla chromaffin granules. *J Biol Chem.* 1995 Apr 7; 270(14):8201-8.

Bader M, Peters J, Baltatu O, Muller DN, Luft FC, Ganten D Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med* 2001 Apr; 79(2-3):76-102.

Bahk JY, Hyun JS, Chung SH, Lee H, Kim MO, Lee BH and Choi WS, Stage specific identification of the expression of GnRH mRNA and localization of the GnRH receptor in mature rat and adult human testis, *J. Urol.* 1995 Nov;154(5):1958-61.

Baker TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries..*Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1963 Oct 22; 158:417-33.

Bannai H, Yoshimura M, Takahashi K, Shingyoji C. Calcium regulation of microtubule sliding in reactivated sea urchin sperm flagella. *J Cell Sci* 2000 Mar; 113 (Pt 5):831-9.

Baranowska B. Bombesin modulates the control of energy homeostasis and pituitary hormone release. *Neuro Endocrinol Lett.* 2009 Mar; 30(1):3-5.

Barrett AJ, Rawlings ND. Evolutionary lines of cysteine peptidases.*Biol Chem.* 2001 May; 382(5):727-33.

Barrett AJ, Rawlings ND. Families and clans of serine peptidases. *Arch Biochem Biophys.* 1995 Apr 0; 318(2):247-50.

Barri PN, Vendrell JM, Martinez F, Coroleu B, Arán B, Veiga A. Influence of spermatogenic profile and meiotic abnormalities on reproductive outcome of infertile patients. *Reprod Biomed Online.* 2005 Jun; 10(6):735-9.

Barros C, Yanagimachi R Induction of zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material *Nature.* 1971 Sep 24; 233(5317):268-9.

Batley J and Wada E Two distinct receptors for mammalian bombesin-like peptides. *Trends Neurosci* 1991 Dec; 14(12):524-8.

Bauvois B, Dauzonne D. Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects.*Med Res Rev.* 2006 Jan; 26(1):88-130.

Bedford JM and Breed WG, Regulated storage and subsequent transformation of spermatozoa in the fallopian tubes of an Australian marsupial *Sminthopsis crassicaudata*, *Biol Reprod* 1994 Apr; 50(4):845-54



Bedford JM The contraceptive potential of fertilization: a physiological perspective. *Hum Reprod.* 1994 May; 9(5):842-58.

Bedu-Addo K, Barratt CL, Kirkman-Brown JC, Publicover SJ. Patterns of  $[Ca^{2+}]_i$  mobilization and cell response in human spermatozoa exposed to progesterone. *Dev Biol* 2007 Feb; 302(1):324-32.

Begley AJ, Quinn P. Decapacitation factors in semen. *Clin Reprod Fertil.* 1982 Sep; 1(3):167-75.

Belaisch-Allart J, Mayenga JM and Plachot M, Intrauterine insemination, *Contracept Fertil Sex* 1999 Sep; 27(9):614-9.

Bellemere G, Vaudry H, Mounien L, Boutelet I and Jegou S, Localization of the mRNA encoding prolyl endopeptidase in the rat brain and pituitary, *J Comp Neurol.* 2004 Mar 29;471(2):128-43.

Belloc S, Cohen-Bacrie P, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie M, De Mouzon J, Hazout A, Ménéz Y. Effect of maternal and paternal age on pregnancy and miscarriage rates after intrauterine insemination. *Reprod Biomed Online.* 2008 Sep; 17(3):392-7.

Bellver J, Garrido N, Remohí J, Pellicer A, Meseguer M. Influence of paternal age on assisted reproduction outcome. *Reprod Biomed Online.* 2008 Nov; 17(5):595-604.

Benchaib M., Lornage J., Mazoyer C., Lejeune H., Salle B., Francois Guerin J. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome *Fertil Steril.* 2007 Jan; 87(1):93-100.

Bendahmane M, Lynch C2nd, Tulsiani DR. Calmodulin signals capacitation and triggers the agonist-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Arch Biochem Biophys.* 2001 Jun 1; 390(1):1-8.

Benoff S, Hurley I, Cooper GW, Mandel FS, Rosenfeld DL, Hershlag A Head-specific mannose-ligand receptor expression in human spermatozoa is dependent on capacitation-associated membrane cholesterol loss. *Hum Reprod.* 1993 Dec; 8(12):2141-54

Bentley GE, et al. Gonadotropin-inhibitory hormone and its receptor in the avian reproductive system. *Gen Comp Endocrinol* 2008 Mar 1; 156(1):34-43.

Bernardini L, Borini A, Preti S, Conte N, Flamigni C, Capitanio GL, Venturini PL. Study of aneuploidy in normal and abnormal germ cells from semen of fertile and infertile men. *Hum Reprod.* 1998 Dec; 13(12): 3406 -13.

Bernardini L, Gianaroli L, Fortini D, Conte N, Magli C, Cavani S, Gaggero G, Tindiglia C, Ragni N, Venturini PL. Frequency of hyper-, hypohaploidy and diploidy in ejaculate, epididymal and testicular germ cells of infertile patients. *Hum Reprod.* 2000 Oct; 15(10): 2165 -72.

Bickel M, Kuhl H, Tan JS, Taubert HD. Evidence of a sex-specific effect of testosterone and progesterone upon L-cystine-aminopeptidase activity in the hypothalamus and paleopallium of the rat. *Neuroendocrinology.* 1972; 9(6):321-31.

Blanco L, Larrinaga G, Pérez I, López JI, Gil J, Agirregoitia E, Varona A. Acid, basic, and neutral peptidases present different profiles in chromophobe renal cell carcinoma and in oncocytoma. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Apr; 294(4):F850-8

Blank MS, Roberts DL. Antagonist of gonadotropin-releasing hormone blocks naloxone-induced elevations in serum luteinizing hormone. *Neuroendocrinology*. 1982 Nov; 35(5):309-12.

Blobel CP, Wolfsberg TG, Turck CW, Myles DG, Primakoff P, White JM A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature*. 1992 Mar; 356(6366):248-52.

Bodineau L, Frugière A, Marc Y, Inguibert N, Massot C, Balavoine F, Roques B, Llorens-Cortes C. Orally Active Aminopeptidase A Inhibitors Reduce Blood Pressure A New Strategy for Treating hipertensión. *Hypertension*. 2008; 51:1318-25.

Bodnar RJ. Endogenous opiates and behavior: 2007. *Peptides*. 2008 Dec; 29(12):2292-375.

Boettger A, Kertscher U, Steinmann C, Baeger U, Siems WE, Heder G. Degradation of bradykinin in semen of ram and boar. *Biochem Pharmacol*. 1993 May 25; 45(10):1983-8.

Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG: International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care *Hum Reprod*. 2007 Jun; 22(6):1506-12.

Boomsma CM, Heineman MJ, Cohlen BJ, Farquhar C Semen preparation techniques for intrauterine insemination.. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Oct 17;(4):CD004507.

Botte MC, Chamagne AM, Carre MC, Counis R and Kottler ML, Fetal expression of GnRH and GnRH receptor genes in rat testis and ovary, *J. Endocrinol*. 1998 Oct; 159(1):179-89.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7; 72:248-54.

Brokaw CJ. Calcium sensors in sea urchin sperm flagella. *Cell Motil Cytoskeleton* . 1991; 18(2): 123 -130.

Bronte A, Stone PD, Ringler GE, Stein AL and Marrs RP, Determinants of the outcome of intrauterine insemination: analysis of outcomes of 9963 consecutive cycles, *Obstet Gynecol* 1999 Jun;180(6 Pt 1):1522-34.

Browder LW, Ericsson CA, Jeffery WR. *Developmental Biology*, cap 3, edit Saunders Collage Publishing, New Cork, 1991.

Brown DR and Miller RJ, Neurotensin, *Br Med Bull.* 1982 Sep; 38(3):239-45.

Browne P, O'Cuinn G. An evaluation of the role of a pyroglutamyl peptidase, a post-proline cleaving enzyme and a post-proline dipeptidyl amino peptidase, each purified from the soluble fraction of guinea-pig brain, in the degradation of thyroliberin in vitro..*Eur J Biochem.* 1983 Dec 1; 137(1-2):75-87.

Brzechffa PR, Daneshmand S and Buyalos RP, Sequential clomiphene citrate and human menopausal gonadotrophin with intrauterine insemination: the effect of patient age on clinical outcome, *Hum Reprod* 1998 Aug; 13(8):2110-4.

Buck J, Sinclair ML, Schapal L, Cann MJ, Levin LR. Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jan 5; 96(1):79-84.

Buffone MG, Calamera JC, Verstraeten SV, Doncel GF. Capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation and membrane fluidity changes are impaired in the spermatozoa of asthenozoospermic patients. *Reproduction* 2005 Jun; 129(6):697-705.

Bull P, Morales P, Huyser C, Socias T and Castellon EA, Expression of GnRH receptor in mouse and rat testicular germ cells, *Mol. Hum. Reprod.* 2000 Jul; 6(7):582-6.

Bungum M., Humaidan P., Axmon A., Spano M., Bungum L., Erenpreiss J., Giwercman A. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome *Hum Reprod.* 2007 Jan; 22(1):174-9.

Burden HP, Holmes CH, Persad R, Whittington K. Prostatosomes--their effects on human male reproduction and fertility. *Hum Reprod Update.* 2006 May-Jun;12(3):283-92.

Burkman J, Coddington CC, Franken DR, Krugen TF, Rosenwaks Z and Hogen GD, The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential, *Fertil Steril* 1988 Apr;49(4):688-97.

Burkman LJ. Characterization of hyperactivated motility by human spermatozoa during capacitation: comparison of fertile and oligozoospermic sperm populations. *Arch Androl* 1984; 13(2-3):153-65.

Burr R, Siegberg R, Matthews C and Flaherty S, The influence of sperm morphology and the number of motile sperm inseminated on the outcome of intrauterine insemination combined with mild ovarian stimulation, *Fertil Steril* 1996 Jan;65(1):127-32.

Bustos-Obregon E, Courot M, Flechon JE, Hochereau-de-Reviere MT, Holstein AF. Morphological appraisal of gametogenesis. Spermatogenesis process in mammals with particular referente to man. *Andrologia* 1975; 7(2):141-63.

Cabello Y, Gomez JL, Castilla JA, Hernandez J, Marqueta J, Vidal E, Fernandez-Shaw S, Herrero J, Luceño F, Coroleu B. Registro FIV-OAC/OAD de la Sociedad Española de Fertilidad, 2007.

Cáceda R, Kinkead B and Nemeroff CB, Neurotensin: role in psychiatric and neurological diseases, *Peptides*. 2006 Oct; 27(10):2385-404.

Cadel S, Foulon T, Viron A, Balogh A, Midol-Monnet S, Noël N, Cohen P. Aminopeptidase B from the rat testis is a bifunctional enzyme structurally related to leukotriene-A4 hydrolase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 Apr 1; 94(7):2963-8.

Cadel S, Gouzy-Darmon C, Petres S, Piesse C, Pham VL, Beinfeld MC, Cohen P, Foulon T. Expression and purification of rat recombinant aminopeptidase B secreted from baculovirus-infected insect cells *Protein Expr Purif*. 2004 Jul; 36(1):19-30.

Cadel S, Pierotti AR, Foulon T, Créminon C, Barré N, Segrétain D, Cohen P. Aminopeptidase-B in the rat testes: isolation, functional properties and cellular localization in the seminiferous tubules *Mol Cell Endocrinol*. 1995 Apr 28; 110(1-2):149-60.

Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Romeo R, Rappazzo G, D'Agata R. Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. *Hum Reprod*. 2001 Jun; 16(6): 1172 -79.

Candenas L, Lecci A, Pinto FM, et al. Tachykinins and tachykinin receptors: effects in the genitourinary tract. *Life Sci* 2005 Jan 7; 76(8):835-62.

Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, Röcken C. Ectopeptidases in tumour biology: a review. *Histol Histopathol*. 2006 Dec; 21(12):1339-53.

Carlson AE, Hille B, Babcock DF. External  $Ca^{2+}$  acts upstream of adenylyl cyclase SACY in the bicarbonate signaled activation of sperm motility. *Dev Biol* 2007 Dec 1; 312(1):183-92.

Carlsson L, Ronquist G, Eliasson R, Egberg N, Larsson A. Flow cytometric technique for determination of prostasomal quantity, size and expression of CD10, CD13, CD26 and CD59 in human seminal plasma. *Int J Androl*. 2006 Apr; 29(2):331-8.

Carlsson L, Ronquist G, Stridsberg M, Johanson L. Motility stimulant effects of prostasome inclusion in swim-up medium on cryopreserved human spermatozoa. *Arch Androl* 1997 May-Jun 38(3):215-21.

Carpentier M, Guillemette C, Bailey JL, Boileau G, Jeannotte L, DesGroseillers L, Charron J. Reduced fertility in male mice deficient in the zinc metallopeptidase NL1. *Mol Cell Biol*. 2004 May; 24(10):4428-37.

Carpentier M, Guillemette C, Bailey JL, Boileau G, Jeannotte L, DesGroseillers L, Charron J. Reduced fertility in male mice deficient in the zinc metallopeptidase NL1. *Mol Cell Biol*. 2004 May; 24(10):4428-37.

Cesselin F. Opioid and anti-opioid peptides. *Fundam Clin Pharmacol*. 1995; 9(5):409-33.

Chambers GM, Sullivan EA, Ishihara O, Chapman MG, Adamson GD. The economic impact of assisted reproductive technology: a review of selected developed countries. *Fertil Steril*. 2009 Jun; 91(6):2281-94.

Chan J. Y. H., Chan S. H. H., Chen C. F. and Barnes C. D. Effects of bestatin on the central cardiovascular regulatory mechanisms in the rat. *Regul Pept.* 1987 Aug 3; 18(2):75-84.

Charli JL, Vargas MA, Cisneros M, de Gortari P, Baeza MA, Jasso P, Bourdais J, Pérez L, Uribe RM, Joseph-Bravo P TRH inactivation in the extracellular compartment: role of proglutamyl peptidase II. *Neurobiology (Bp)*. 1998; 6(1):45-57.

Checler F, The prepro-neurotensin/neuromedin N gene: structural organization, regulation of expression and post-transcriptional events. In: A.J. Turner, Editor, *Frontiers in Neurobiology: Neuropeptide Gene Expression*, Portland Press, Portland 1994, pp. 133-160.

Chen CL, Chang CC, Krieger DT, Bardin CW. Expression and regulation of proopiomelanocortin-like gene in the ovary and placenta: comparison with the testis. *Endocrinology*. 1986 Jun; 118(6):2382-9.

Chen CL, Madigan MB. Regulation of testicular proopiomelanocortin gene expression. *Endocrinology*. 1987 Aug; 121(2):590-6.

Chen JM, Rawlings ND, Stevens RA, Barrett AJ. Identification of the active site of legumain links it to caspases, clostripain and gingipains in a new clan of cysteine endopeptidases. *FEBS Lett.* 1998 Dec 28; 441(3):361-5.

Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Iourgenko V, Sinclair ML, Levin LR, Buck J. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science*. 2000 Jul 28; 289(5479):625-8.

Chesneau V, Prat A, Segretain D, Hospital V, Dupaix A, Foulon T, Jégou B, Cohen P. NRD convertase: a putative processing endoprotease associated with the axoneme and the manchette in late spermatids. *J Cell Sci.* 1996 Nov; 109 (Pt 11):2737-45.

Chiwakata C, Brackmann B, Hunt N, et al. Tachykinin (substance-P) gene expression in Leydig cells of the human and mouse testis. *Endocrinology* 1991 May; 128(5):2441-8.

Cicero TJ, Schainker BA, Meyer ER Endogenous opioids participate in the regulation of the hypothalamus-pituitary-luteinizing hormone axis and testosterone's negative feedback control of luteinizing hormone. *Endocrinology*. 1979 May; 104(5):1286-91.

Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 1963; 112:35-51.

Cohen-Dayag A, Tur-Kaspa I, Dor J, Mashiach S, Eisenbach M Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Nov 21; 92(24):11039-43.

Collard MW, Day R, Akil H, Uhler MD, Douglass JO. Sertoli cells are the primary site of prodynorphin gene expression in rat testis: regulation of mRNA and secreted peptide levels by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate analogs in cultured cells. *Mol Endocrinol.* 1990 Oct; 4(10):1488-96.

Comb M, Seeburg PH, Adelman J, Eiden L, Herbert E Primary structure of the human Met-and Leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature*. 1982 Feb 25; 295(5851):663-6.

Conn PM and Crowley Jr. WF, Gonadotropin-releasing hormone and its analogs, *Annu. Rev. Med.* 1994; 45:391-405.

Conrad KP, Gellai M, North WG, and Valtin H. Influence of oxytocin on renal hemodynamics and sodium excretion. *Ann NY Acad Sci* 1993 Jul 22; 689:346-62,

Correa LM, Cho C, Myles DG, Primakoff P. A role for a TIMP-3-sensitive, Zn(2+)-dependent metalloprotease in mammalian gamete membrane fusion. *Dev Biol*. 2000 Sep 1; 225(1):124-34

Corvol P. ACE sets up fertilization. *Nat Med*. 2005 Feb; 11(2):118-9.

Cosentino MJ, Cockett AT. Structure and function of the epididymis..*Urol Res*. 1986; 14(5):229-40.

Cummins PM, O'Connor B. Pyroglutamyl peptidase: an overview of the three known enzymatic forms. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Dec; 1429(1):1-17.

Cutrona G, Leanza N, Ulivi M, Melioli G, Burgio VL, Mazzarello G, Gabutti G, Roncella S, Ferrarini M.Expression of CD10 by human T cells that undergo apoptosis both in vitro and in vivo. *Blood*. 1999 Nov 1; 94(9):3067-76.

Dando PM, Fortunato M, Strand GB, Smith TS, Barrett AJ. Pyroglutamyl-peptidase I: cloning, sequencing, and characterisation of the recombinant human enzyme. *Protein Expr Purif* 2003 Mar; 28:111-119.

Danielsen EM. Dimeric assembly of enterocyte brush border enzymes *Biochemistry*. 1994 Feb 15; 33(6):1599-605.

de Gandarias JM, Irazusta J, Echevarria E, Casis L. Aspartate-aminopeptidase activity during the estrous cycle and the pregnancy in rat brain and pituitary gland. *Exp Clin Endocrinol*. 1993; 101(3):156-60.

de Gandarias JM, Irazusta J, Echevarría E, Casis L. Neutral aminopeptidase activity levels during the estrous cycle and the pregnancy in the hypothalamus and the pituitary of the rat. *Life Sci*. 1993; 52(20):1629-32 (a)

de Gandarias JM, Irazusta J, Fernández D, Echevarría E, Casis L. Brain Lys-aminopeptidase activity. Changes during cycle and pregnancy. *Eur J Endocrinol*. 1994 Apr; 130(4):373-7 (c).

de Gandarias JM, Irazusta J, Fernández D, Gallego M, Silió M, Casis L. Membrane-bound tyrosine aminopeptidase activities in the rat brain throughout the estrous cycle. *Life Sci*. 1996; 59(13):1097-101.

de Gandarias JM, Irazusta J, Gil J, Echevarría E, Casis L. Leu-arylamidase activity levels during the estrous cycle and pregnancy in several extrahypothalamic areas of the rat brain. *Gen Physiol Biophys*. 1993 Apr; 12(2):131-9. (b)

de Gandarias JM, Irazusta J, Gil J, Fernández D, Casis L. Brain soluble and membrane-bound Tyr-aminopeptidase activities during the stages of estrous and proestrous in the female rat. *Brain Res*. 1993 Aug 20; 620(1):146-8

de Gandarias JM, Ramirez M, Zulaica J, Casis L. Aminopeptidase (arylamidase) activity in discrete areas of the rat brain: sex differences. *Horm Metab Res*. 1989 May; 21(5):285-6.

de La Rochebrochard E, Thonneau P. Paternal age: are the risks of infecundity and miscarriage higher when the man is aged 40 years or over? *Rev Epidemiol Sante Publique*. 2005 Nov; 53 Spec No 2:2S47-55.

de Mota M, Iturrioz X, Claperon C, Bodineau L, Fasso C, Roques BP, Palkovits M and Llorens-Cortes C. Human brain aminopeptidase A: biochemical properties and distribution in brain nuclei. *J Neurochem*. 2008 Jul; 106(1):416-28.

Dean J. Biology of mammalian fertilization: role of the zona pellucida. *J Clin Invest* 1992 Apr; 89(4):1055-9.

Debeljuk L and Lasaga M. Modulation of the hypothalamo-pituitary-gonadal axis and the pineal gland by neurokinin A, neuropeptide K and neuropeptide gamma. *Peptides* 1999; 20(2):285-99.

Debeljuk L, Rao JN, Bartke A Tachykinins and their possible modulatory role on testicular function: a review. *Int J Androl*. 2003 Aug; 26(4):202-10.

Delitala G, Grossman A, Besser GM. Changes in pituitary hormone levels induced by met-enkephalin in man--the role of dopamine. *Life Sci*. 1981 Oct 12; 29(15):1537-44.

Delmas B, Gelfi J, L'Haridon R, Vogel LK, Sjöström H, Norén O, Laude H. Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature*. 1992 Jun 4; 357(6377):417-20.

DeMott RP, Suarez SS. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol Reprod* 1992 May; 46(5):779-85.

Di Daniel E, Glover CP, Trot E, Chan MK, Sanderson TH, White JH, Ellis CL, Gallagher KT, Uney J, Thomas J, Maycox PR and Mudge AW, Prolyl oligopeptidase binds to GAP-43 and functions without its peptidase activity, *Mol. Cell Neurosci*. 41 (2009), pp. 373-382.

Díaz-Pérez E, Meizel S. Importance of mammalian sperm metalloendoprotease activity during the acrosome reaction to subsequent sperm-egg fusion: inhibitor studies with human sperm and zona-free hamster eggs. *Mol Reprod Dev*. 1992 Feb; 31(2):122-30.

Dickey RP, Taylor SN, Lu PY, Sartor BM, Rye PH, Pyrzak R. Effect of diagnosis, age, sperm quality, and number of preovulatory follicles on the outcome of multiple cycles of clomiphene citrate-intrauterine insemination. *Fertil Steril* 2002 Nov; 78(5):1088-95.

Dierich A, Sairam MR, Monaco L, Fimia GM, Gansmuller A, LeMeur M, Sassone-Corsi P. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov 10; 95(23):13612-7.

Dobrinski I, Smith T, Suarez SS and Ball BA, Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro, *Biol Reprod* 1997 Apr; 56(4):861-9.

Dodson WC and Haney AF. Controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination for treatment of infertility. *Fertil Steril* 1991 Mar; 55(3):457-67.

Dong KW, Duval P, Zeng Z, Gordon K, Williams RF, Hodgen GD, Jones G, Kerdelhue B, Roberts JL. Multiple transcription start sites for the GnRH gene in rhesus and cynomolgus monkeys: a non-human primate model for studying GnRH gene regulation. *Mol Cell Endocrinol*. 1996 Mar 25; 117(2):121-30.

Dong KW, Yu KL and Roberts JL, Identification of a major up-stream transcription start site for the human progonadotropin-releasing hormone gene used in reproductive tissues and cell lines, *Mol. Endocrinol*. 1993 Dec; 7(12):1654-66.

Douglass J, Cox B, Quinn B, Civelli O, Herbert E. Expression of the prodynorphin gene in male and female mammalian reproductive tissues. *Endocrinology*. 1987 Feb; 120(2):707-13.

Dubois V, Van Ginneken C, De Cock H, Lambeir AM, Van der Veken P, Augustyns K, Chen X, Scharpé S, De Meester I Enzyme activity and immunohistochemical localization of dipeptidyl peptidase 8 and 9 in male reproductive tissues. *J Histochem Cytochem*. 2009 Jun; 57(6):531-41.

Ducibella T, Kurasaawa S, Rangarajan S, Kopf GS, Schultz RM Precocious loss of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with an egg-induced modification of the zona pellucida. *Dev Biol*. 1990 Jan; 137(1):46-55.

Durakbasi Dursun-HG, Zamani AG, Kutlu R, Görkemli H, Bahce M, Acar A. A new approach to chromosomal abnormalities in sperm from patients with oligoasthenoteratozoospermia: detection of double aneuploidy in addition to single aneuploidy and diploidy by five-color fluorescence in situ hybridization using one probe set. *Fertil Steril*. 2008 Jun; 89(6):1709-17.

Duran He, M. Mahmood, T. Kruger and S. Oehninger, Intrauterine insemination: a systematic review on determinants of success, *Hum Reprod Update* 2002 Jul-Aug; 8(4):373-84.

Dyer SH, Slaughter CA, Orth K, Moomaw CR, Hersh LB. Comparison of the soluble and membrane-bound forms of the puromycin-sensitive enkephalin-degrading aminopeptidases from rat.. *J Neurochem*. 1990 Feb; 54(2):547-54.

Eblen A, Bao S, Lei ZM, Nakajima ST, Rao CV. The presence of functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human sperm. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Jun; 86(6):2643-8.

Eisenbach M, Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation, *Dev Genet* 1999; 25(2):87-94.



Eisenbach M, Ralt D Precontact mammalian sperm-egg communication and role in fertilization. *Am J Physiol*. 1992 May; 262(5 Pt 1):C1095-101.

Ellington JE, Evenson DP, Fleming JE, Brisbois RS, Hiss GA and Broder SJ *et al.*, Coculture of human sperm with bovine oviduct epithelial cells decreases sperm chromatin structural changes seen during culture in media alone, *Fertil Steril* 1998 Apr; 69(4):643-9.

Engel M, Hoffmann T, Wagner L, Wermann M, Heiser U, Kiefersauer R, Huber R, Bode W, Demuth HU, Brandstetter H. The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 29; 100(9):5063-8.

Erdem A, Erdem M, Atmaca S, Korucuoglu U, Karabacak O Factors affecting live birth rate in intrauterine insemination cycles with recombinant gonadotrophin stimulation. *Reprod Biomed Online*. 2008 Aug;17(2):199-206.

Erdös EG, Schulz WW, Gafford JT, Defendini R. Neutral metalloendopeptidase in human male genital tract. Comparison to angiotensin I-converting enzyme. *Lab Invest*. 1985 Apr; 52(4):437- 47.

Erickson RH, Gum JR, Lotterman CD, Hicks JW, Lai RS, Kim YS. Regulation of the gene for human dipeptidyl peptidase IV by hepatocyte nuclear factor 1 alpha. *Biochem J*. 1999 Feb 15; 338 (Pt 1):91-7.

Eskeland NL, Lugo DI, Pintar JE, Schachter BS. Stimulation of beta-endorphin secretion by corticotropin-releasing factor in primary rat Leydig cell cultures. *Endocrinology*. 1989 Jun; 124(6):2914-9.

Eskiocak S, Gozen AS, Yapar SB, Tavas F, Kilic AS, Eskiocak M. Glutathione and free sulphhydryl content of seminal plasma in healthy medical students during and after exam stress. *Hum Reprod* 2005 Sep; 20(9):2595-600.

Eposito G, Jaiswal BS, Xie F, Krajnc-Franken MA, Robben TJ, Strik AM, Kuil C, Philipson RL, van Duin M, Conti M, Gossen JA. Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 2; 101(9):2993-8.

Evenson DP, Larson KL and Jost LK, Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques, *J Androl*. 2002 Jan-Feb; 23(1):25-43.

Fabbri A, Dufau ML. Hormonal regulation of beta-endorphin in the testis. *J Steroid Biochem*. 1988; 30(1-6):347-52.

Fabbri A, Fraioli F, Isidori A. Opioid peptides in the testis and the male genital tract: presence and possible function. *J Endocrinol Invest*. 1986 Dec; 9(6):521-8.

Fabbri A, Jannini EA, Gnessi L, Ulisse S, Moretti C, Isidori A. Neuroendocrine control of male reproductive function. The opioid system as a model of control at multiple sites. *J Steroid Biochem*. 1989 Jan; 32(1B):145-50.

Fabbri A, Knox G, Buczko E, Dufau ML. Beta-endorphin production by the fetal Leydig cell: regulation and implications for paracrine control of Sertoli cell function. *Endocrinology*. 1988 Feb; 122(2):749-55.

Fabbri A, Tsai-Morris CH, Luna S, Fraioli F, Dufau ML. Opiate receptors are present in the rat testis. Identification and localization in Sertoli cells. *Endocrinology*. 1985 Dec; 117(6):2544-6.

Faivre-Bauman A, Loudes C, Barret A, Tixier-Vidal A, Bauer K. Possible role of neuropeptide degrading enzymes on thyroliberin secretion in fetal hypothalamic cultures grown in serum free medium. *Neuropeptides*. 1986 Feb-Mar; 7(2):125-38

Falconieri Erspamer G, Severini C, Erspamer V, Melchiorri P, Delle Fave G, and Nakajima T Parallel bioassay of 27 bombesin-like peptides on 9 smooth muscle preparations, structure-activity relationships and bombesin receptor subtypes. *Regul Pept* 1988 May; 21(1-2):1-11.

Feki N, Therond P, Couturier M, Limea G, Legrand A and Jouannet p *et al.*, Human sperm lipid content is modified after migration into human cervical mucus, *Mol Human Reprod* 2004 Feb;10(2):137-42.

Fernández D, Valdivia A, Irazusta J, Ochoa C, Casis L. Peptidase activities in human semen. *Peptides*. 2002 Mar; 23(3):461-8.

Fernandez DJ. Papel de las aminopeptidasas cerebrales en la liberacion de gonadotropinas. Tesis doctoral; Facultad de Medicina y Odontologia, UPV/EHU. 1996.

Fleischer B. CD26: a surface protease involved in T-cell activation. *Immunol Today*. 1994 Apr; 15(4):180-4.

Flesch FM, Colenbrander B, van Golde LM, Gadella BM. Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Sep 7; 262(3):787-92.

Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Nov 10;1469(3):197-235.

Florman HM, Tombes RM, First NL, Babcock DF An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations of internal Ca<sup>2+</sup> and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Dev Biol* 1989 Sep; 135(1):133-46.

Foldesy RG, Bedford JM. Biology of the scrotum. I. Temperature and androgen as determinants of the sperm storage capacity of the rat cauda epididymidis. *Biol Reprod* 1982 May; 26(4):673-82.

Foresta C, Tramarin A, Scandellari C, Arslan P. Effects of a met-enkephalin analogue on motility, O<sub>2</sub> consumption, and ATP content of human spermatozoa. *Arch Androl*. 1985; 14(2-3):247-52.

Foulon T, Cadel S, Cohen P. Aminopeptidase B (EC 3.4.11.6). *Int J Biochem Cell Biol*. 1999 Jul; 31(7):747-50.

Fournié-Zaluski MC, Coric P, Turcaud S, Lucas E, Noble F, Maldonado R, Roques BP "Mixed inhibitor-prodrug" as a new approach toward systemically active inhibitors of enkephalin-degrading enzymes. *J Med Chem.* 1992 Jun 26; 35(13):2473-81.

Fraioli F, Fabbri A, Gnessi L, Moretti C, Bonifacio V, Isidori A, Dufau M. Naloxone increases bioactive LH in man: evidence for selective release of early LH pool. *J Endocrinol Invest.* 1985 Dec; 8(6):513-7.

Fraioli F, Panerai AE, Santoro C, Fabbri A, Santoro F, Isidori A. Control of gonadotropin secretion in man: role of opioid peptides. *Horm Metab Res.* 1982 Jun; 14(6):312-6.

Franklin LE. Formation of the redundant nuclear envelope in monkey spermatids. *Anat Rec* 1968 Jun; 161(2):149-61

Fraser LR and Adeoya-Osiguwa SA Fertilization promoting peptide – a possible regulator of sperm function. *Vit Horm.* 2001; 63:1-28.

Fraser LR and Adeoya-Osiguwa SA Modulation of adenylyl cyclase by FPP and adenosine involves stimulatory and inhibitory adenosine receptors and G proteins. *Mol Reprod Dev.* 1999 Aug; 53(4):459-71.

Fraser LR and Olufunmilayo OO. Human sperm responses to calcitonin, angiotensin II and fertilization-promoting peptide in prepared semen samples from normal donors and infertility patients. *Hum Reprod.* 2004 March; 19(3): 596-606.

Fraser LR, Hosseini R, Hanyaloglu A, Talmor A and Dudley RK. TCP-11, the product of a mouse t-complex gene, plays a role in stimulation of capacitation and inhibition of the spontaneous acrosome reaction. *Mol Reprod Dev* 1997 Nov; 48(3):375-82.

Fraser LR, Pondel MC and Vinson GP Calcitonin, angiotensin II and FPP significantly modulate mouse sperm function. *Mol Hum Reprod* 2001 March; 7(3):245-53.

Frayne J, and Nicholson HD. Localization of oxytocin receptors in the human and macaque monkey male reproductive tracts: evidence for a physiological role of oxytocin in the male. *Mol Hum Reprod* 1998 Jun; 4(6):527-32.

Frenette G, Lessard C, Sullivan R, Selected proteins of "prostasome-like particles" from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal capuz spermatozoa in bull. *Biol Reprod.* 2002; Jul 67(1):308-13.

Fricker L. D. Activation and membrane binding of carboxypeptidase E. *J Cell Biochem.* 1988 Dec; 38(4):279-89.

Fuchs AR, and Fuchs F. Endocrinology of human parturition: a review. *Br J Obstet Gynecol* 1984 Oct; 91(10):948-67.

Fujisawa M, Bardin CW, Morris PL. A germ cell factor(s) modulates preproenkephalin gene expression in rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1992 Mar; 84(1-2):79-88.

Fujisawa M, Kanzaki M, Okada H, Arakawa S, Kamidono S. Metenkephalin in seminal plasma of infertile men. *Int J Urol* 1996; 3:297-300.

Funahashi H, Fujuwara T and Nagai T Modulation of the function of boar spermatozoa via adenosine and fertilization promoting peptide receptors reduce the incidence of polyspermic penetration into porcine oocytes. *Biol Reprod* 2000 Oct; 63(4):1157-63.

Fuse Y, Polk DH, Lam RW, Fisher DA. Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH) and precursor peptide (TRH-Gly) in adult rat tissues *Endocrinology*. 1990 Nov; 127(5):2501-5.

Fusi FM, Bernocchi N, Ferrari A, Bronson RA. Is vitronectin the velcro that binds the gametes together? *Mol Hum Reprod*. 1996 Nov; 2(11):859-66.

Gaddum-Rosse P. Some observations on sperm transport through the uterotubal junction of the rat. *Am J Anat* 1981 Mar; 160(3):333-41.

Gainer H., Russell J. T. and Loh Y. P. An aminopeptidase activity in bovine pituitary secretory vesicles that cleaves the N-terminal arginine from beta-lipotropin. *FEBS Lett*. 1984 Sep 17; 175(1):135-9.

Gainer H., Russell J. T. and Loh Y. P. The enzymology and intracellular organization of peptide precursor processing: the secretory vesicle hypothesis. *Neuroendocrinology*. 1985 Feb; 40(2):171-84.

Ganju RK, Shpektor RG, Brenner DG, Shipp MA. CD10/neutral endopeptidase 24.11 is phosphorylated by casein kinase II and coassociates with other phosphoproteins including the lyn src-related kinase. *Blood*. 1996 Dec 1; 88(11):4159-65.

García-Horsman JA, Männistö PT and Venäläinen JI. On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease *Neuropeptides* 2007 Feb; 41(1):1-24.

Garrett JE, Collard MW, Douglass JO. Translational control of germ cell-expressed mRNA imposed by alternative splicing: opioid peptide gene expression in rat testis. *Mol Cell Biol*. 1989 Oct; 9(10):4381-9.

Gass J, Khosla C. Prolyl endopeptidases. *Cell Mol Life Sci*. 2007 Feb; 64(3):345-55.

Gatti JL, Castella S, Dacheux F, Ecroyd H, Métayer S, Thimon V, Dacheux JL. Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim Reprod Sci*. 2004 Jul; 82-83:321-39.

Gerendai I, Shaha C, Gunsalus GL, Bardin CW. The effects of opioid receptor antagonists suggest that testicular opiates regulate Sertoli and Leydig cell function in the neonatal rat. *Endocrinology* 1986 May; 118(5):2039-44.

Ghaddar G, Ruchon AF, Carpentier M, Marcinkiewicz M, Seidah NG, Crine P, Desgroseillers L, Boileau G. Molecular cloning and biochemical characterization of a new mouse testis soluble-zinc-metallopeptidase of the neprilysin family. *Biochem J*. 2000 Apr 15; 347(Pt 2):419-29.

Giladi E, Nagalla SR, Spindel ER. Molecular cloning and characterization of receptors for the mammalian bombesin-like peptides. *J Mol Neurosci*. 1993 Spring; 4(1):41-54.

Gnessi L, Isidori A, Bolotti M, Altamura S, Ulisse S, Jannini EA, Fabbri A, Spera G. Identification of immunoreactive gastrin-releasing peptide related substances in adult rat Leydig cells. *Endocrinology*. 1989 Jan; 124(1):558-60.

Gomori G. Chromogenic substrates for aminopeptidase. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1954 Dec; 87(3):559-61.

Gondos B, Westergaard L, Byskov AG Initiation of oogenesis in the human fetal ovary: ultrastructural and squash preparation study. *Am J Obstet Gynecol.* 1986 Jul; 155(1):189-95.

Gonzalez Merlo J Marquez M. Patología del endometrio Barcelona: editorial Científico-Médica; 1972.

Gonzalez-Gronow M, Grenett HE, Weber MR, Gawdi G, Pizzo SV. Interaction of plasminogen with dipeptidyl peptidase IV initiates a signal transduction mechanism which regulates expression of matrix metalloproteinase-9 by prostate cancer cells. *Biochem J.* 2001 Apr 15; 355(Pt 2):397-407.

Gordts S, Campo R, Rombauts L, Brosens I Endoscopic visualization of the process of fimbrial ovum retrieval in the human. *Hum Reprod.* 1998 Jun; 13(6):1425-8.

Gore AC, GnRH cells out side the nervous system. In: A.C. Gore, Editor, *GnRH: The Master Molecule of Reproduction*, Kluwer Academic Publishers, Boston (2002).

Gorrell MD. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. *Clin Sci (Lond).* 2005 Apr; 108(4):277-92.

Gorus FK, Finsy R, Pipeleers DG. Effect of temperature, nutrients, calcium, and cAMP on motility of human spermatozoa. *Am J Physiol.* 1982 May; 242(5):C304-11.

Gorus FK, Pipeleers DG. A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility *Fertil Steril.* 1981 Jun; 35(6):662-5.

Gotoh H, Hagihara M, Nagatsu T, Iwata H, Miura T. Activity of dipeptidyl peptidase IV and post-proline cleaving enzyme in sera from osteoporotic patients. *Clin Chem.* 1988 Dec; 34(12):2499-501.

Gougeon A Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 1996 Apr; 17(2):121-55.

Goumon Y., Lugardon K., Gadroy P., Strub J. M., Welters I. D., Stefano G. B., Aunis D. and Metz-Boutigue M. H. Processing of proenkephalin-A in bovine chromaffin cells. Identification of natural derived fragments by N-terminal sequencing and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Biol Chem.* 2000 Dec 8; 275(49):38355-62J.

Goverde A, Vermeiden J, Schats R, Rutten F and Schomaker J, Intrauterine insemination or in-vitro fertilization in idiopathic subfertility: a randomised trial and cost effectiveness analysis, *Lancet* 2000 Jan 1;355(9197):13-8.

Goverde AJ, McDonnell J, Vermeiden JP, Schats R, Rutten FF, Schoemaker J. Intrauterine insemination or in-vitro fertilisation in idiopathic subfertility and male subfertility: a randomised trial and cost-effectiveness analysis. *Lancet* 2000 Jan 1; 355(9197):13-8.

Green DP. Mammalian fertilization as a biological machina: a working model for adhesión and fusión of sperm and oocyte *Hum Reprod* 1993 Jan; 8(1):91-6.

Greenberg LJ. Fluorometric measurement of alkaline phosphatase and aminopeptidase activities in the order of 10<sup>-14</sup> mole. *Biochem Biophys Res Commun.* 1962 Nov 27; 9:430-5.

Greube A, Muller K, Topfer-Petersen E, Hermann A and Muller P, Influence of the bovine seminal plasma protein PDC-109 on the physical state of membranes, *Biochemistry* 2001 Jul 27; 40(28):8326-34.

Gualtieri R, Boni R, Tosti E, Zagami M and Talevi R, Intracellular calcium and protein tyrosine phosphorylation during the release of bovine sperm adhering to the fallopian tube epithelium in vitro, *Reproduction* 2005 Jan; 129(1):51-60.

Guérif F Which assisted reproduction technique as a function of sperm morphology? *Gynecol Obstet Fertil.* 2010 Aug 6 [Epub ahead of print].

Gupta P, Franco-Saenz R, Mulrow PJ. Locally generated angiotensin-II in the adrenal gland regulates basal, corticotropin-stimulated, and potassium-stimulated aldosterone secretion. *Hypertension* 1995; 25:443-448.

Gutkowska J, Jankowski M, Lambert C, Mukaddam DS, Zingg HH, and McCann SM. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 Oct 14; 94(21):11704-9.

Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiología medica, cap 9, Edit Mc-Graw-Hill interamericana, Madrid, 1997.

Guzick DS, Carson SA, Coutifaris C, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Steinkampf MP, Hill JA, Mastroianni L, Buster JE, Nakajima ST, et al. (1999) Efficacy of superovulation and intrauterine insemination in the treatment of infertility. National Cooperative Reproductive Medicine Network. *N Engl J Med* . 1999 Jan 21; 340(3):177-83.

Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA, Xu D, Vogel DL; National Cooperative Reproductive Medicine Network. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men *N Engl J Med.* 2001 Nov 8; 345(19):1388-93.

Gwathmey TM, Ignatz GG and Suarez SS, PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir, *Biol Reprod* 2003 Sep; 69(3):809-15.

Gwathmey TM, Ignatz GG, Mueller JK, Manjunath P and Suarez SS, Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kda share functional roles in storing sperm in the oviduct, *Biol Reprod* 2006 Oct; 75(4):501-7.

Hagaman JR, Moyer JS, Bachman ES, Siboney M, Magyar PL, Welch JE, Smithies O, Krege JH, O'Brien DA Angiotensin-converting enzyme and male fertility. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 Mar 3; 95(5):2552-7.

Hanif K, Lederis K, Hollenberg MD, and Goren HJ. Inability of oxytocin to activate pyruvate dehydrogenase in the Brattleboro rat. *Science* 1982 May 28; 216(4549):1010-2.

Hanski C, Huhle T, Gossrau R, Reutter W. Direct evidence for the binding of rat liver DPP IV to collagen in vitro. *Exp Cell Res.* 1988 Sep; 178(1):64-72

Hansson V, Reusch E, Trygstad O, Torgersen O, Ritzen EM, French FS. FSH stimulation of testicular androgen binding protein. *Nat New Biol.* 1973 Nov 14; 246(150):56-8.

Harper CV, Publicover SJ. Reassessing the role of progesterone in fertilization-compartmentalized calcium signalling in human spermatozoa? *Hum Reprod* 2005 Oct;20(10):2675-80.

Harris SJ, Milligan MP, Masson GM, Dennis KJ. Improved separation of motile sperm in asthenospermia and its application to artificial insemination homologous (AIH) homologous (AIH). *Fertil Steril.* 1981 Aug; 36(2):219-21.

Havre PA, Abe M, Urasaki Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dang NH. The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. *Front Biosci.* 2008 Jan 1; 13:1634-45.

Hayashi T, Tsao LI, Su TP. Antiapoptotic and cytotoxic properties of delta opioid peptide [D-Ala(2),D-Leu(5)]enkephalin in PC12 cells. *Synapse.* 2002 Jan; 43(1):86-94.

Heckert LL, Griswold MD. The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. *Recent Prog Horm Res.* 2002; 57:129-48.

Heder G, Böttger A, Siems WE, Rottmann M, Kertscher U. The enzymatic degradation of bradykinin in semen of various species. *Andrologia.* 1994 Sep-Oct; 26(5):295-301.

Heffner LJ, Storey BT. The role of calcium in maintaining motility in mouse spermatozoa. *J Exp Zool.* 1981 Dec; 218(3): 427 - 34.

Herrick SB, Schweissinger DL, Kim SW, Bayan KR, Mann S, Cardullo RA. The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J Cell Physiol* 2005 Mar; 202(3):663-71.

Hersh LB Degradation of enkephalins: the search for an enkephalinase. *Mol Cell Biochem.* 1982 Aug 20; 47(1):35-43.

Hill R. M., Ledgerwood E. C., Brennan S. O., Pu L.-P., Loh Y. P. and Christie D. L. Comparison of the molecular forms of the Kex2/subtilisin-like serine proteases SPC2, SPC3, and furin in neuroendocrine secretory vesicles reveals differences in carboxyl-terminus truncation and membrane association. *J Neurochem.* 1995 Nov; 65(5):2318-26.

Himelstein-Braw R, Byskov AG, Peters H, Faber M Follicular atresia in the infant human ovary. *J Reprod Fertil.* 1976 Jan; 46(1):55-9.

Hinuma S, et al. New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nat Cell Biol* 2000 Oct;2(10):703-8.

Ho HC, Granish KA, Suarez SS. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca<sup>2+</sup> and not cAMP. *Dev Biol.* 2002 Oct; 250(1):208-17.

Ho HC, Suarez SS. An inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor-gated intracellular Ca<sup>2+</sup> store is involved in regulating sperm hyperactivated motility. *Biol Reprod* 2001 Nov; 65(5):1606-15.

Hoang MV, Sansom CE, Turner AJ. Mutagenesis of Glu403 to Cys in rabbit neutral endopeptidase-24.11 (neprilysin) creates a disulphide-linked homodimer: analogy with endothelin-converting enzyme. *Biochem J*. 1997 Nov 1; 327 (Pt 3):925-9.

Holland- Moritz H, Krause W. Semen analysis and fertility prognosis in andrological patients. *Int J Androl*. 1992 Dec; 15 (6):473-84.

Hook V. Y. H. and Yasothornsrikul S. Carboxypeptidase and aminopeptidase proteases in proneuropeptide processing, in *Proteolytic and Cellular Mechanisms in Prohormone and Proprotein Processing* (Hook V. Y. H., ed.)1998, pp. 121-140. Landes Bioscience, Georgetown, TX.

Hook VYH., Azaryan AV, Hwang SR. and Tezapsidis N. Proteases and the emerging role of protease inhibitors in prohormone processing. *FASEB J*. 1994 Dec; 8(15):1269-78.

Hook V., Yasothornsrikul S., Greenbaum D., Medzihradzky K. F., Troutner K., Toneff T., Bunday R., Reinheckel T., Peters C. and Bogyo M. Cathepsin L and Arg/Lys aminopeptidase: a distinct prohormone processing pathway for the biosynthesis of peptide neurotransmitters and hormones. *Biol Chem*. 2004 Jun; 385(6):473-80.

Hopsu VK, Mäkinen KK, Glenner GG. Characterization of aminopeptidase B: substrate specificity and affector studies. *Arch Biochem Biophys*. 1966 Jun; 114(3):567-75.

Huang HF, Pogach LM, Nathan E, Giglio W, Seebode JJ. Synergistic effects of folliclestimulating hormone and testosterone on the maintenance of spermiogenesis in hypophysectomized rats: relationship with the androgen-binding protein status. *Endocrinology*. 1991 Jun; 128(6):3152-61.

Huang K, Takahara S, Kinouchi T, Takeyama M, Ishida T, Ueyama H, Nishi K, Ohkubo I. Alanine aminopeptidase from human seminal plasma: purification, characterization, and immunohistochemical localization in the male genital tract. *J Biochem*. 1997 Oct; 122(4):779- 87.

Hughes J. Biogenesis, release and inactivation of enkephalins and dynorphins. *Br Med Bull*. 1983 Jan; 39(1):17-24.

Hunter RHF, Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation, *J Reprod Fertil* 1981 Sep; 63(1):109-17.

Hwang SR, O'Neill A, Bark S, Foulon T, Hook V. Secretory vesicle aminopeptidase B related to neuropeptide processing: molecular identification and subcellular localization to enkephalin- and NPY-containing chromaffin granules. *J Neurochem*. 2007 Mar; 100(5):1340-50. Epub 2007 Jan 11.

Ibérico G, Vioque J, Ariza N, Lozano JM, Roca M, Llacer J, Bernabeu R. Analysis of factors influencing pregnancy rates in homologous intrauterine insemination. *Fertil Steril* 2004 May; 81(5):1308-13.



Ignotz GG, Cho MY and Suarez SS, Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir, *Biol Reprod* 2007 Dec; 77(6):906-13.

Ignotz GG, Suarez SS. Calcium/calmodulin and calmodulin kinase II stimulate hyperactivation in demembrated bovine sperm. *Biol Reprod* 2005 Sep; 73(3):519-26.

Ikeda K, Emoto N, Raharjo SB, Nurhantari Y, Saiki K, Yokoyama M, Matsuo M. Molecular identification and characterization of novel membrane-bound metalloprotease, the soluble secreted form of which hydrolyzes a variety of vasoactive peptides. *J Biol Chem*. 1999 Nov 5; 274(45):32469-77.

Inaba K Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling.. *Zoolog Sci*. 2003 Sep; 20(9):1043-56.

Ino K., Goto S., Kosaki A., Nomura S., Asada E., Misawa T., Furuhashi Y., Mizutani S. and Tomoda Y. Growth inhibitory effect of bestatin on choriocarcinoma cell lines in vitro. *Biotherapy*. 1991; 3(4):351-7.

Irazusta J, Valdivia A, Fernández D, Agirregoitia E, Ochoa C, Casis L. Enkephalin-degrading enzymes in normal and subfertile human semen. *J Androl*. 2004 Sep-Oct; 25(5):733-9.

Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. D.S. Irvine, J.P. Twigg and E.L. Gordon et al., DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality, *J Androl*. 2000 Jan-Feb; 21(1):33-44.

Ivell R, and Richter D. The gene for the hypothalamic peptide hormone oxytocin is highly expressed in the bovine corpus luteum: biosynthesis, structure and sequence analysis. *EMBO J* 1984 Oct; 3(10):2351-4.

Iwaki-Egawa S, Watanabe Y, Kikuya Y, Fujimoto Y. Dipeptidyl peptidase IV from human serum: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *J Biochem*. 1998 Aug; 124(2):428-33.

Iwase A, Shen R, Navarro D, Nanus DM Direct binding of neutral endopeptidase 24.11 to ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins competes with the interaction of CD44 with ERM proteins. *J Biol Chem*. 2004 Mar 19; 279(12):11898-905.

Izumi SI, Makino T, Iizuka R. Immunoreactive luteinizing hormone-releasing hormone in the seminal plasma and human semen parameters. *Fertil Steril* 1985 Apr; 43(4):617-20.

Jacotot E, Callebaut C, Blanco J, Rivière Y, Krust B, Hovanessian AG. HIV envelope glycoprotein-induced cell killing by apoptosis is enhanced with increased expression of CD26 in CD4+ T cells. *Virology*. 1996 Sep 15; 223(2):318-30.

Jaiswal BS, Conti M. Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 16; 100(19):10676-81.

Jansen RP. Cyclic changes in the human fallopian tube isthmus and their functional importance. *Am J Obstet Gynecol* 1980 Feb; 136(3):292-308.

Jardinaud F, Banisadr G, Noble F, Mélik-Parsadaniantz S, Chen H, Dugave C, Laplace H, Rostène W, Fournié-Zaluski MC, Roques BP, Popovici T. Ontogenic and adult whole body distribution of aminopeptidase N in rat investigated by in vitro autoradiography. *Biochimie*. 2004 Feb; 86(2):105-13.

Jee Song G, Herko R and Lewis V Location of semen collection and time interval from collection to use for intrauterine insemination *Fertil Steril* 2007 Dec 88(6):1689-91.

Jegou B, Brekke I, Naess O, Torjesen P, Hansson V. Properties and regulation of GnRH receptors in the anterior pituitary and the testis of the rat: different response of Leydig cell LH and GnRH receptors to hormonal treatments. *Arch Androl* 1985; 14(2-3):161-70.

Jensen RT, Battey JF, Spindel ER, Benya RV. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacol Rev*. 2008 Mar; 60(1):1-42.

Jequier AM Crich J: Semen análisis: a practical guide. Blackwell Scientific publications, Oxford, 1986.

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*. 1984 Jan; 70(1):219-28.

Jin J, Jin N, Zheng H, Ro S, Tafolla D, Sanders KM, Yan W. CatSper3 and CatSper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility. *Biol Reprod* 2007 Jul; 77(1):37-44.

Johnson MA, Tsutsui K, Fraley GS Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm Behav* 2007 Jan; 51(1):171-80.

Jones HP, Lenz RW, Palevitz BA, Cormier MJ. Calmodulin localization in mammalian spermatozoa. *PNAS*. 1980 May; 77(5):2772-6.

Jung K, Pergande M, Wischke UW. Characterization of particulate and soluble variants of the brush-border enzymes alanine aminopeptidase, alkaline phosphatase and gamma-glutamyltransferase in human urine. *Biomed Biochim Acta*. 1984; 43(12):1357-64.

Kaiser UB, Conn PM and Chin WW, Studies of gonadotropin-releasing hormone action using gonadotropin-releasing hormone receptor expressing pituitary cell lines, *Endocr. Rev*. 1997 Feb; 18(1):46-70.

Kakidani H, Furutani Y, Takahashi H, Noda M, Morimoto Y, Hirose T, Asai M, Inayama S, Nakanishi S, Numa S. Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neoendorphin/dynorphin precursor.. *Nature*. 1982 Jul 15; 298(5871):245-9.

Kang S, Cheng K, Nathwani P, Choi K and Leung P, Autocrine role of gonadotropin-releasing hormone and its receptor in ovarian cancer cell growth, *Endocrinology* 2000 Dec; 13(3):297-304.

Karuppaswamy J, Smedley M, Carter L. Intra-uterine insemination: pregnancy rate in relation to number, size of pre-ovulatory follicles and day of insemination. *J Indian Med Assoc.* 2009 Mar; 107(3):141-3.

Katz DF, Drobnis EZ, Overstreet JW Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments..*Gamete Res* 1989 Apr; 22(4):443-69.

Kerr JB. Functional cytology of the human testis. *Bailliere Clin Endocrinol Metab* 1992 Apr 6(2):235-50.

Kerr MA, Kenny AJ. Cell surface peptidases are neither peptide nor organ specific. *Trends Biochem. Sci.*1986; 11:40-42.

Kerr MA, Kenny AJ.The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border.*Biochem J.* 1974 Mar; 137(3):477-88.

Kew D, Jin DF, Kim F, Laddis T, Kilpatrick DL. Translational status of proenkephalin mRNA in the rat reproductive system. *Mol Endocrinol.* 1989 Aug; 3(8):1191-6.

Kew D, Kilpatrick DL. Expression and regulation of the proenkephalin gene in rat Sertoli cells. *Mol Endocrinol.* 1989 Jan; 3(1):179-84.

Kew D, Muffly KE, Kilpatrick DL. Proenkephalin products are stored in the sperm acrosome and may function in fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Dec; 87(23):9143-7.

Kikkawa F, Kajiyama H, Shibata K, Ino K, Nomura S, Mizutani S. Dipeptidyl peptidase IV in tumor progression.*Biochim Biophys Acta.* 2005 Aug 1; 1751(1):45-51.

Kilpatrick DL, Borland K, Jin DF. Differential expression of opioid peptide genes by testicular germ cells and somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Aug; 84(16):5695-9.

Kilpatrick DL, Howells RD, Noe M, Bailey LC, Udenfriend S. Expression of preproenkephalin-like mRNA and its peptide products in mammalian testis and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Nov; 82(21):7467-9.

Kilpatrick DL, Millette CF. Expression of proenkephalin messenger RNA by mouse spermatogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Jul; 83(14):5015-8.

Kilpatrick DL, Zinn SA, Fitzgerald M, Higuchi H, Sabol SL, Meyerhardt J. Transcription of the rat and mouse proenkephalin genes is initiated at distinct sites in spermatogenic and somatic cells. *Mol Cell Biol.* 1990 Jul; 10(7):3717-26.

Kim E, Baba D, Kimura M, Yamashita M, Kashiwabara S, Baba T. Identification of a hyaluronidase, *hyal5*, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 Dec; 102(50):18028-33.

Kimura A, Matsui H, Takahashi T. Expression and localization of prolyl oligopeptidase in mouse testis and its possible involvement in sperm motility.. *T. Zoolog Sci* 2002 Ene;19(1):93-102.

- Kioussi C, Crine P, Matsas R. Endopeptidase-24.11 is suppressed in myelin-forming but not in non-myelin-forming Schwann cells during development of the rat sciatic nerve. *Neuroscience*. 1992 Sep; 50(1):69-83.
- Kirby ED, Geraghty AC, Ubuka T, Bentley GE, Kaufer D. Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jul 7; 106(27):11324-9.
- Kirichok Y, Navarro B, Clapham DE. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated  $Ca^{2+}$  channel. *Nature* 2006 Feb; 439(7077):737-40.
- Kohlstedt K, Brandes RP, Müller-Esterl W, Busse R, Fleming I. Angiotensin-converting enzyme is involved in outside-in signaling in endothelial cells. *Circ Res*. 2004 Jan 9; 94(1):60-7.
- Kondoh G, Tojo H, Nakatani Y, Komazawa N, Murata C, Yamagata K, Maeda Y, Kinoshita T, Okabe M, Taguchi R, Takeda J. Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization. *Nat Med*. 2005 Feb;11(2):160-6.
- Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol*. 2010 May; 48(5):425-35.
- Kramer W, Girbig F, Corsiero D, Pfenninger A, Frick W, Jähne G, Rhein M, Wendler W, Lottspeich F, Hochleitner EO, Orsó E, Schmitz G. Aminopeptidase N (CD13) is a molecular target of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in the enterocyte brush border membrane. *J Biol Chem*. 2005 Jan 14; 280(2):1306-20.
- Kriegsfeld LJ, Mei DF, Bentley GE, Ubuka T, Mason AO, Inoue K, Ukena K, Tsutsui K, Silver R Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 Feb 14; 103(7):2410-5.
- Krzanowska H.J The passage of abnormal spermatozoa through the uterotubal junction of the mouse. *Reprod Fertil* 1974 May; 38(1):81-90.
- Kuhl H, Rosnatiowski C, Taubert HD. The activity of an LH-RH-degrading enzyme in the anterior pituitary during the rat oestrus cycle and its alteration by injections of sex hormones. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1978 Mar; 87(3):476-84.
- Kuhl H, Taubert HD. Short-loop feedback mechanism of luteinizing hormone: LH stimulated hypothalamic L-cystine arylamidase to inactivate LH-RH in the rat hypothalamus. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1975 Apr; 78(4):649-63.
- Lähdetie J, Saari N, Ajosenpaa-Saari M, Mykkanen J. Incidence of aneuploid spermatozoa among infertile men studied by multicolour fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet*. 1997 Jul 11; 71(1): 115 -21.
- Lambeir AM, Durinx C, Scharpé S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2003 Jun; 40(3):209-94.

Laorden ML, Milanes MV, Chapleur CM, and Bulet A. Changes in hypothalamic oxytocin levels during morphine tolerance. *Neuropeptides* 1997 Apr;31(2):143-6.

Lapointe S, Sullivan R and Sirard MA, Binding of a bovine oviductal fluid catalase to mammalian spermatozoa, *Biol Reprod* 1998 Mar; 58(3):747-53.

Lathrop WF, Carmichael EP, Myles DG, Primakoff P cDNA cloning reveals the molecular structure of a sperm surface protein, PH-20, involved in sperm-egg adhesion and the wide distribution of its gene among mammals. *J Cell Biol.* 1990 Dec; 111(6 Pt 2):2939-49.

Lauffart B, Mantle D. Rationalization of aminopeptidase activities in human skeletal muscle soluble extract. *Biochim Biophys Acta.* 1988 Oct 12; 956(3):300-6.

Lefebvre R and Suarez SS, Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium, *Biol Reprod* 1996 Mar; 54(3):575-82.

Lefebvre R, Lo MC and Suarez SS, Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition, *Biol Reprod* 1997 May; 56(5):1198-204.

Legros JJ, Chiodera P, and Geenen V. Inhibitory action of exogenous oxytocin on plasma cortisol in normal human subjects: evidence of action at the adrenal level. *Neuroendocrinology* 1988 Aug; 48(2):204-6.

Lei ZM, Rao CV. Neural actions of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin. *Semin Reprod Med.* 2001; 19(1):103-9.

Lendeckel U, Arndt M, Frank K, Wex T, Ansorge S. Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells (review). *Int J Mol Med.* 1999 Jul; 4(1):17-27

Lerman SA, Miller GK, Bohlman K, Albaladejo V, Léonard JF, Devas V, Clark RL. Effects of corticosterone on reproduction in male Sprague-Dawley rats. *Reprod Toxicol* 1997 Nov-Dec; 11(6):799-805.

Lescheid DW, Terasawa E, Abler LA, Urbanski HF, Warby CM, Miller RP and Sherwood NM, A second form of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) with characteristics of chicken GnRH-II is present in the primate brain, *Endocrinology* 1997 Dec;138(12):5618-29.

Letarte M, Vera S, Tran R, Addis JB, Onizuka RJ, Quackenbush EJ, Jongeneel CV, McInnes RR Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J Exp Med.* 1988 Oct 1; 168(4):1247-53.

Leung PC, Cheng CK and Zhu XM, Multi-factorial role of GnRH-I and GnRH-II in the human ovary, *Mol. Cell. Endocrinol.* 2003 Apr 28; 202(1-2):145-53.

Leung PS, Carlsson PO. Pancreatic islet renin angiotensin system: its novel roles in islet function and in diabetes mellitus. *Pancreas.* 2005 May; 30(4):293-8.

Leung PS, Sernia C. The renin-angiotensin system and male reproduction: new functions for old hormones. *J Mol Endocrinol* 2003 Jun; 30(3):263-70.

- Levy R, Eustache F, Pilikian S, Clavel C, Cordonier H, Benchaib M, Lornage J, Pinatel MC, Guerin JF Effect of gastrin-releasing peptide on sperm functions. *Mol Hum Reprod*. 1996 Nov; 2(11):867-72.
- Leyton L, LeGuen P, Bunch D, Saling PM Regulation of mouse gamete interaction by a sperm tyrosine kinase..*Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Dec; 89(24):11692-5.
- Li C, Booze RM, Hersh LB.Tissue-specific expression of rat neutral endopeptidase (neprilysin) mRNAs. *J Biol Chem*. 1995 Mar 17; 270(11):5723-8.
- Li HG, Ding XF, Liao AH, Kong XB, Xiong CL. Expression of catsper family transcripts in the mouse testis during post-natal development and human ejaculated spermatozoa: relationship to sperm motility. *Mol Hum Reprod* 2007 May; 13(5):299-306.
- Licht RS, Handel L, Sigman M. Site of semen collection and its effect on semen analysis parameters. *Fertil Steril*. 2008 Feb; 89(2):395-7.
- Liguori L, Rambotti MG, Bellezza I, Minelli A. Electron microscopic cytochemistry of adenylyl cyclase activity in mouse spermatozoa. *J Histochem Cytochem*. 2004 Jun; 52(6):833-6.
- Lin Y, Mahan K, Lathrop WF, Myles DG, Primakoff P A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg..*J Cell Biol*. 1994 Jun; 125(5):1157-63.
- Lindemann CB, Goltz JS. Calcium regulation of flagellar curvature and swimming pattern in Triton X-100-extracted rat sperm. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1988; 10(3): 420-31.
- Litvin TN, Kamenetsky M, Zarifyan A, Buck J, Levin LR. Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *J Biol Chem*. 2003 May 2; 278(18):15922-6.
- Liu DY and Baker HWG, A simple method for assessment of the human acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: lack of relationship with ionophore A23187-induced acrosome reaction, *Hum Reprod* 1996 Mar; 11(3):551-7.
- Liu DY and Baker HWG, Relationship between the zona pellucida (ZP) and ionophore A23187-induced acrosome reaction and the ability of sperm to penetrate the ZP in men with normal sperm-ZP binding, *Fertil Steril* 1996 Aug;66(2):312-5.
- Liu DY, Garrett C, Baker HW .Clinical application of sperm-oocyte interaction tests in vitro fertilization--embryo transfer and intracytoplasmic sperm injection programs. *Fertil Steril*. 2004 Nov; 82(5):1251-63.
- Liu DY, Lopata A and Baker HWG, Use of oocytes that failed to be fertilized in vitro to study human sperm-oocyte interactions: comparison of sperm-oolemma and sperm-zona pellucida binding, and relationship with results of IVF, *Reprod Fertil Dev*. 1990;2(6):641-50.

Liu DY, Lopata A, Johnston WIH and Baker HWG, A human sperm-zona pellucida binding test using oocytes that failed to fertilize in vitro, *Fertil Steril* 1988 Nov; 50 (5) :782-8.

Loh Y. P., Parish D. C. and Tuteja R. Purification and characterization of a paired basic residue-specific pro-opiomelanocortin converting enzyme from bovine pituitary intermediate lobe secretory vesicles. *J Biol Chem*. 1985 Jun 25; 260(12):7194-205.

Lojda Z. and Gossrau R. Study on aminopeptidase A. *Histochemistry*. 1980; 67(3):267-90.

Look AT, Ashmun RA, Shapiro LH, Peiper SC. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *J Clin Invest*. 1989 Apr; 83(4):1299-307.

Lopata A, Sathananthan AH, McBain JC, Johnston WI, Speirs AL The ultrastructure of the preovulatory human egg fertilized in vitro. *Fertil Steril*. 1980 Jan; 33(1):12-20.

Lopez-Gonzalez I, De La Vega-Beltran JL, Santi CM, Florman HM, Felix R, Darszon A. Calmodulin antagonists inhibit T-type Ca(2+) currents in mouse spermatogenic cells and the zona pellucida-induced sperm acrosome reaction. *Dev Biol*. 2001 Aug 1; 236(1):210-9.

Lowry PJ. Has the mechanism by which the endocrine placenta scavenges the mother whilst sparing the foetus been unmasked? *J Mol Endocrinol* 2003 Dec; 31(3):341-7.

Luan Y, Xu W. The structure and main functions of aminopeptidase N. *Curr Med Chem*. 2007; 14(6):639-47.

Ludmir J, Sehdev HM. Anatomy and physiology of the uterine cervix..*Clin Obstet Gynecol*. 2000 Sep; 43(3):433-9.

MacKenzie SM, Fraser R, Connell JM, Davies E 2002 Local renin-angiotensin systems and their interactions with extra-adrenal corticosteroid production. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2002 Dec; 3(4): 214-21.

Mahony MC, Gwathmey T. Protein tyrosine phosphorylation during hyperactivated motility of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. *Biol Reprod* 1999 May; 60(5):1239-43.

Malfroy B, Kuang WJ, Seeburg PH, Mason AJ, Schofield PR. Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). *FEBS Lett*. 1988 Feb 29; 229(1):206-10.

Männistö PT, Venäläinen J, Jalkanen A, García-Horsman JA Prolyl oligopeptidase: a potential target for the treatment of cognitive disorders. *Drug News Perspect*. 2007 Jun; 20(5):293-305.

Marcel D, Pollard H, Verroust P, Schwartz JC, Beaudet A. Electron microscopic localization of immunoreactive enkephalinase (EC 3.4.24.11) in the neostriatum of the rat. *J Neurosci*. 1990 Aug; 10(8):2804-17.

Margioris AN, Liotta AS, Vaudry H, Bardin CW, Krieger DT Characterization of immunoreactive proopioidmelanocortin-related peptides in rat testes. *Endocrinology*. 1983 Aug; 113(2):663-71.

Mari G, Rizzato G, Iacono E, Merlo B, Minoia R, Belluzzi S. Effects of beta-endorphin and naloxone on motility of cooled equine spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. 2005 Oct; 89(1-4):223-5.

Marigomez I, Cajaraville MP. Célula Udako Euskal Unibertsitatea argitalaia, Bilbo, 1999.

Marina S, Advances in the Knowledges of spermatogenesis. Clinical implications. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 2003 Julio-Agosto; 4(20):213-24.

Marin-Briggiler CI, Jha KN, Chertihin O, Buffone MG, Herr JC, Vazquez-Levin MH, Visconti PE. Evidence of the presence of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in human sperm and its involvement in motility regulation. *J Cell Sci*. 2005 May 1; 118(Pt 9):2013-22.

Marks N, Datta RK, Lajtha A Partial resolution of brain arylamidases and aminopeptidases. *Biol Chem*. 1968 Jun 10; 243(11):2882-9.

Marks N, Datta RK, Lajtha A. The relationship of aminotripeptidase and arylamidase to ptopein breakdown in the brain. In " Macromolecules and Function of the Neurone", 1968. *Lodin, Z Ed*, Excerpta Medica, Amsterdam.

Marks N, Stern F, Lajtha A.Changes in proteolytic enzymes and proteins during maturation of the brain. *Brain Res*. 1975 Mar 21; 86(2):307-22.

Maroux S Structural and topological aspects. In "Mammalian Ectoenzymes",pp.15-45. Kenny AJ y AJ Turner Eds. Elsevier Science Publisher, Amsterdam, The Netherlands, 1987.

Martens H, Kecha O, Charlet RC, Defresne MP, and Geenen V. Neurohypophysial peptides stimulate the phosphorylation of pre-T cell focal adhesion kinases. *Neuroendocrinology* 1998 Apr; 67(4):282-9.

Martin RH, Rademaker AW, Greene C, Ko E, Hoang T, Barclay L, Chernos J. A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia. *Biol Reprod*. 2003 Aug; 69(2): 535 -39.

Martin RH. Meiotic chromosome abnormalities in human spermatogenesis. *Reprod Toxicol*. 2006 Aug; 22(2):142-7.

Mateu E, Rodrigo L, Prados N Gil-salom M, Remohí J, Pellicer A and Rubio C High Incidence of Chromosomal Abnormalities in Large-Headed and Multiple-Tailed Spermatozoa *J Androl*. 2006 Jan-Feb; 27(1):6-10.

Matsas R, Kenny AJ.Immunocytochemical localization of endopeptidase-24.11 in cultured neurons from pig striatum. *Neuroscience*. 1989; 31(1):237-46.



Matsuda-Minehata F, Inoue N, Goto Y, Manabe N The regulation of ovarian granulosa cell death by pro- and anti-apoptotic molecules. *J Reprod Dev.* 2006 Dec; 52(6):695-05.

Matsumoto AM. Spermatogenesis. In: Hadáís EY, Rock JA, Rosenwaks Z (eds) *Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology.* Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia 1996; 360-384.

Mayas M. D., Ramírez-Expósito M. J., García M. J., Carrera P. and Martínez-Martos J. M. Ethanol modulates neuropeptide-degrading aminopeptidases at synapse level in calcium-dependent conditions. *Alcohol Alcohol.* 2004 Sep-Oct; 39(5):393-405.

Mc Donnell M, Fitzgerald R, Fhaoláin IN, Jennings PV, O'Cuinn G. Purification and characterization of aminopeptidase P from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *J Dairy Res.* 1997 Aug; 64(3):399-407.

McDonald JK, Barret AJ. Mammalian porteases. In "A Glosary and Bibliography. Vol 2: Exopeptidases" 1986 Academic Press, London U.K.

McDonald TJ, Ghatei MA, Bloom SR, Adrian TE, Mochizuki T, Yanaihara C, and Yanaihara N Dose-response comparisons of canine plasma gastroentero-pancreatic hormone responses to bombesin and the porcine gastrin-releasing peptide (GRP). *Regul Pept* 1983 Jan; 5(2):125-37.

McDonnell M, Fitzgerald R, Ni Fhaolain I, Jennings PV, O'Cuinn G. The possible role of aminopeptidases from starter culture *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* AM2 in cheese making. *Biochem Soc Trans.* 1997 Feb; 25(1):119S.

McKinley MJ, Albiston AL, Allen AM, Mathai ML, May CN, McAllen RM, Oldfield BJ, Mendelsohn FA, Chai SY 2003 The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2003 Jun; 35(6):901-18.

McLellan S, Dyer SH, Rodriguez G, Hersh LB. Studies on the tissue distribution of the puromycin-sensitive enkephalin-degrading aminopeptidases. *J Neurochem.* 1988 Nov; 51(5):1552-9.

Means AR, Tash JS, Chafouleas JG. Physiological implications of the presence, distribution, and regulation of calmodulin in eukaryotic cells. *Physiol Rev.* 1982 Jan; 62(1):1-39.

Mehta ND, Don J, Zinn SA, Millette C, Wolgemuth DJ, Kilpatrick DL. Proenkephalin gene expression in testicular interstitial cells is down-regulated coincident with the appearance of pachytene spermatocytes. *Endocrinology.* 1994 Oct; 135(4):1543-50

Memo M, Castelletti L, Valerio A, Missale C and Spano PF, Identification of neurotensin receptors associated with calcium channels and prolactin release in rat pituitary, *J. Neurochem.* 1986 Dec; 47(6):1682-8.

Merviel P, Heraud MH, Grenier N, Lourdel E, Sanguinet P, Copin H. Predictive factors for pregnancy after intrauterine insemination (IUI): an analysis of 1038 cycles and a review of the literature *Fertil Steril.* 2010 Jan; 93(1):79-88.

Millar R, Lowe S, Conklin D, Pawson A, Maudsley S, Troskie B, Ott T, Millar M, Lincoln G, Sellar R, Faurholm B, Scobie G, Kuestner R, Terasawa E and Katz A, A novel mammalian receptor for the evolutionarily conserved type II GnRH, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001 Aug 14;98(17):9636-41.

Miller D, Ostermeier GC. Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum Reprod Update.* 2006 Nov-Dec; 12(6):757-67. Epub 2006 Aug 1. Review.

Miller R., Aaron W., Toneff T., Vishnuvardhan D., Beinfeld M. and Hook V. Y. H. Obliteration of alpha-melanocyte-stimulating hormone derived from POMC in pituitary and brains of PC2-deficient mice. *J Neurochem.* 2003 Aug; 86(3):556-63.

Minamino N, Kangawa K, and Matsuo H Neuromedin B is a major bombesin-like peptide in rat brain: regional distribution of neuromedin b and neuromedin c in rat brain, pituitary and spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* 1984 Nov 14; 124(3):925-32.

Minamino N, Kangawa K, and Matsuo H Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* 1983 Jul; 114(2):541-8

Mina-Osorio P, Ortega E. Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with FcγR3s in human monocytes. *J Leukoc Biol.* 2005 Jun; 77(6):1008-17.

Mina-Osorio P, Shapiro LH, Ortega E. CD13 in cell adhesion: aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells. *J Leukoc Biol.* 2006 Apr; 79(4):719-30.

Mina-Osorio P. The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends Mol Med.* 2008 Aug; 14(8):361-71.

Minaretzis D, Jakubowski M, Mortola JF and Pavlou SN, Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in human ovary and granulosa-lutein cells, *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1995 Feb; 80(2):430-4.

Mitchell BF, Fang X, and Wong S. Mitchell BF, Fang X, and Wong S. Oxytocin: a paracrine hormone in the regulation of parturition? *Rev Reprod* 1998 May; 3(2):113-22.

Miyazaki T, Katz E, Dharmarajan AM, Wallach EE, Atlas SJ. Do prostaglandins lead to ovulation in the rabbit by stimulating proteolytic enzyme activity? *Fertil Steril* 1991 Jun; 55(6):1182-88.

Mollereau C, Simons MJ, Soularue P, Liners F, Vassart G, Meunier JC, Parmentier M. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Aug 6; 93(16):8666-70.

Monks NJ, Stein DM, Fraser LR Adenylate cyclase activity of mouse sperm during capacitation in vitro: effect of calcium and a GTP analogue. *Int J Androl.* 1986 Feb; 9(1):67-76.

Monsees TK, Görnig M, Schill WB, Miska W. Possible involvement of proteases in the regulation of spermatogenesis. *Andrologia*. 1998 Aug-Sep; 30(4-5):185-91.

Monsuur AJ, Stepniak D, Diosdado B, Wapenaar MC, Mearin ML, Koning F, Wijmenga C. Genetic and functional analysis of pyroglutamyl-peptidase I in coeliac disease. *C. Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006 Jun; 18(6):637-44.

Moody TW, Merali Z. Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: distribution and behavioral implications. *Peptides*. 2004 Mar; 25(3):511-20.

Moosani N, Pattinson HA, Carter MD, Cox DM, Rademaker AW, Martin RH. Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril*. 1995 Oct; 64(4): 811 - 7.

Morain P, Robin JL, De Nanteuil Jochensemsen R, Heidet V and Guez D. Pharmacodynamic and pharmacokinetic profile of S 17092, a new orally active prolyl endopeptidase inhibitor, in elderly healthy volunteers. A phase I study, *Br J Clin Pharmacol*. 2000 Oct; 50(4):350-9.

Morain, P.H. Boeijinga, A. Demazières, G. De Nanteuil and R. Luthringer, Psychotropic profile of S 17092, a prolyl endopeptidase inhibitor, using quantitative EEG in young healthy volunteers, *Neuropsychobiology*. 2007; 55(3-4):176-83.

Morales P, Overstreet JW, Katz DF. Changes in human sperm motion during capacitation in vitro. *J Reprod Fertil* 1988 May; 83(1):119-28.

Morales P. Gonadotropin-releasing hormone increases ability of the spermatozoa to bind to the human zona pellucida. *Biol Reprod*. 1998 Aug; 59(2):426-30

Morikawa K., Morikawa S., Nakano A. and Oseko F. Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, suppresses the proliferation and differentiation of human C-cells in vitro. *Int J Immunopharmacol*. 1989; 11(8):905-13.

Morse HC, Horike N, Rowley MJ, Heller CG. Testosterone concentrations in testes of normal men: effects of testosterone propionate administration. *J Clin Endocrinol Metab*. 1973 Dec; 37(6):882-6.

Mortimer D, Mortimer ST. Influence of system parameter settings on human sperm motility analysis using CellSoft. *Hum Reprod*. 1988 Jul; 3(5):621-5.

Mortimer D. Practical laboratory andrology, New York: Oxford University Press, 1994.

Mortimer ST A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update*. 1997 Sep-Oct; 3(5):403-39.

Mortimer ST, Swan MA . Variable kinematics of capacitating human spermatozoa. *Hum Reprod* 1995 Dec; 10(12):3178-82.

Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JB. Sperm DNA Damage: Correlation to Severity of Semen Abnormalities. *Urology*. 2009 Oct; 74(4):789-93.

Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JB. Leukocytospermia: relationship to sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male factor infertility. *Fertil Steril* 2007 Sept; 88(3):737-40.

Mulrow PJ. Renin-angiotensin system in the adrenal. *Horm Metab Res* 1998 Jun-Jul; 30(6-7):346-9.

Munkelwitz R, Gilbert BR. Are boxer shorts really better? A critical analysis of the role of underwear type in male subfertility. *Urol*. 1998 Oct; 160(4):1329-33.

Murad C, De Lamirande E, Gagnon C. Hyperactivated motility is coupled with interdependent modifications at axonemal and cytosolic levels in human spermatozoa. *J Androl* 1992 Jul-Aug; 13(4):323-31.

Myöhänen TT, Kääriäinen TM, Jalkanen AJ, Piltonen M, Männistö PT. Localization of prolyl oligopeptidase in the thalamic and cortical projection neurons: a retrograde neurotracing study in the rat brain. *Neurosci Lett*. 2009 Jan 30; 450(2):201-5.

Nagatsu I., Nagatsu T., Yamamoto T., Glenner G. G. and Mehl J. W. Purification of aminopeptidase A in human serum and degradation of angiotensin II by the purified enzyme. *Biochim Biophys Acta*. 1970 Feb 11; 198(2):255-70.

Nakanishi S, Inoue A, Kita T, Nakamura M, Chang AC, Cohen SN, Numa S. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature*. 1979 Mar 29; 278(5703):423-7.

Nalivaeva NN, Fisk LR, Belyaev ND, Turner AJ. Amyloid-degrading enzymes as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2008 Apr; 5(2):212-24.

Navarro B, Kirichok Y, Clapham DE. K<sup>+</sup>Sper, a pH-sensitive K<sup>+</sup> current that controls sperm membrane potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 May; 104(1):7688-92.

Nichol R, Hunter RH, Gardner DK, Leese HJ, Cooke GM. Concentrations of energy substrates in oviductal fluid and blood plasma of pigs during the peri-ovulatory period. *J Reprod Fertil* 1992 Nov; 96(2):699-707.

Nicholson HD, and Jenkin L. Oxytocin and prostatic function. *Exp Biol Med. Adv.* 1995; 395:529-38

Nicholson HD. Oxytocin: a paracrine regulator of prostatic function. *Rev Reprod* 1996 May; 1(2):69-72.

Nikpoor P, Mowla SJ, Movahedin M, Ziaee SA, Tiraihi T. Catsper gene expression in postnatal development of mouse testis and in subfertile men with deficient sperm motility. *Hum Reprod* 2004 Jan; 19(1):124-8.

Nishikawa N, Murakami I, Ikuta K, Suzumori K. Sex chromosomal analysis of spermatozoa from infertile men using fluorescence in situ hybridization. *J Assist Reprod Genet*. 2000 Feb; 17(2): 97 -102.

Nishimura H, Kim E, Nakanishi T and Baba T, Possible function of the ADAM1a/ADAM2 Fertilin complex in the appearance of ADAM3 on the sperm surface, *J Biol Chem* 2004 Aug 13; 279(33):34957-62.

Nolan MA, Babcock DF, Wennemuth G, Brown W, Burton KA, McKnight GS. Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit Calpha2 orchestrates cAMP signaling for male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep; 101(37): 13483-8.

Nomura R, Kiyota A, Suzaki E, Kataoka K, Ohe Y, Miyamoto K, Senda T, Fujimoto T. Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae. *J Virol*. 2004 Aug; 78(16):8701-8.

Nuojua-Huttunen S, Tomas C, Bloigu R, Tuomivaara L, Martikainen H Intrauterine insemination treatment in subfertility: an analysis of factors affecting outcome, *Hum Reprod*. 1999 Mar; 14(3):698-703.

Nyboe Andersen A, Erb K., Register data on Assisted Reproductive Technology (ART) in Europe including a detailed description of ART in Denmark *Int J Androl*. 2006 Feb; 29(1):12-6.

Nyboe Andersen A, Goossens V, Bhattacharya S, Ferraretti AP, Kupka MS, de Mouzon J, Nygren KG; European IVF-monitoring (EIM) Consortium, for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registers by ESHRE: ESHRE. The European IVF Monitoring Programme (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). *Hum Reprod*. 2009 Jun; 24(6):1267-87.

O'Cuinn G, O'Connor B, Elmore M. Degradation of thyrotropin-releasing hormone and luteinising hormone-releasing hormone by enzymes of brain tissue. *J Neurochem*. 1990 Jan; 54(1):1-13.

O'Hara BF, Donovan DM, Lindberg I, Brannock MT, Ricker DD, Moffatt CA, Klaunberg BA, Schindler C, Chang TS, Nelson RJ, et al. Proenkephalin transgenic mice: a short promoter confers high testis expression and reduced fertility. *Mol Reprod Dev*. 1994 Jul; 38(3):275-84.

Ohki-Hamazaki H, Iwabuchi M, and Maekawa F Development and function of bombesin-like peptides and their receptors. *Int J Dev Biol* 2005; 49(2-3):293-300.

Ohnuma K, Yamochi T, Uchiyama M, Nishibashi K, Yoshikawa N, Shimizu N, Iwata S, Tanaka H, Dang NH, Morimoto C. CD26 up-regulates expression of CD86 on antigen-presenting cells by means of caveolin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 28; 101(39):14186-91.

Oikawa M, Dargan C, Ny T and Hsueh AJ, Expression of gonadotropin-releasing hormone and prothymosin-alpha messenger ribonucleic acid in the ovary, *Endocrinology* 1990 Nov; 127(5):2350-6.

Okada H, Suh WK, Jin J, Woo M, Du C, Elia A, Duncan GS, Wakeham A, Itie A, Lowe SW, Wang X, Mak TW. Generation and characterization of Smac/DIABLO-deficient mice. *Mol Cell Biol*. 2002 May; 22(10):3509-17.

O'Leary RM, Gallagher SP, O'Connor B. Purification and characterization of a novel membrane-bound form of prolyl endopeptidase from bovine brain. *Int J Biochem Cell Biol*. 1996 Apr; 28(4):441-9.

Olsen J, Cowell GM, Kønigshøfer E, Danielsen EM, Møller J, Laustsen L, Hansen OC, Welinder KG, Engberg J, Hunziker W, et al. Complete amino acid sequence of human intestinal aminopeptidase N as deduced from cloned cDNA. *FEBS Lett.* 1988 Oct 10; 238(2):307-14.

O'Mahony OH, Djahanbakhch O, Mahmood T, Puddefoot JR and Vinson GP Angiotensin II in human seminal fluid. *Hum Reprod* 2000 Jun; 15(6):1345-9.

O'Mahony OA, Barker S, Puddefoot JR, Vinson GP. Synthesis and secretion of angiotensin II by the prostate gland in vitro. *Endocrinology.* 2005 Jan; 146(1):392-8.

Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents.. *Science.* 1977 Apr 22; 196(4288):441-4.

Oren-Benaroya R, Orvieto R, Gakamsky A, Pinchasov M and Eisenbach M, The sperm chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone, *Human Reprod* 2008 Oct; 23(10):2339-45.

Orth JM. FSH-induced Sertoli cell proliferation in the developing rat is modified by betaendorphin produced in the testis. *Endocrinology.* 1986 Oct; 119(4):1876-8.

Osada T, Watanabe G, Kondo S, Toyoda M, Sakaki Y, Takeuchi T. Male reproductive defects caused by puromycin-sensitive aminopeptidase deficiency in mice. *Mol Endocrinol.* 2001 Jun; 15(6):960-71.

Quimet T, Facchinetti P, Rose C, Bonhomme MC, Gros C, Schwartz JC. Neprilysin II: A putative novel metalloprotease and its isoforms in CNS and testis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 May 19; 271(3):565-70.

Overstreet JW, Gould JE, Katz DF, Hanson FW In vitro capacitation of human spermatozoa after passage through a column of cervical mucus. *Fertil Steril.* 1980 Dec; 34(6):604-6.

Pacey AA, Davies N, Warren MA, Barratt CL, Cooke ID. Hyperactivation may assist human spermatozoa to detach from intimate association with the endosalpinx. *Hum Reprod* 1995 Oct; 10(10):2603-9.

Page NM, Bell NJ, Gardiner SM, et al. Characterization of the endokinins: human tachykinins with cardiovascular activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 May 13; 100(10):6245-50.

Palmerini CA, Saccardi C, Carlini E, Fabián R, Arienti G. Fusion of prostasomes to human spermatozoa stimulates the acrosome reaction. *Fertil Steril.* 2003 Nov; 80(5):1181-84.

Pan JT, Tian Y, Lookingland KJ and Moore KE, Neurotensin-induced activation of hypothalamic dopaminergic neurons is accompanied by a decrease in pituitary secretion of prolactin and alpha-melanocyte-stimulating hormone, *Life Sci.* 1992;50(25):2011-7.

Pan YX, Xu J, Pasternak GW. Cloning and expression of a cDNA encoding a mouse brain orphanin FQ/nociceptin precursor. *Biochem J.* 1996 Apr 1; 315 (Pt 1):11-3.

Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ, Moon SY, Doncel GF, Acosta AA, Kearns WG. Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoastheno-teratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1999 May; 14(5): 1266 -73.

Panula P, Nieminen O, Falkenberg M and Auvinen S. Localization and development of bombesin/GRP-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Y N Ann Acad Sci* 1988; 547: 54-69.

Panula P, Yang HY y Costa E. Neuronal location of the bombesin-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. *Regul PEPT* 1982 Oct; 4(5):275-83.

Parish D. C., Tuteja R., Altstein M., Gainer H. and Loh Y. P. Purification and characterization of a paired basic residue-specific prohormone-converting enzyme from bovine pituitary neural lobe secretory vesicles. *J Biol Chem.* 1986 Nov 5; 261(31):14392-7.

Parrington J, Swann K, Shevchenko VI, Sesay AK, Lai FA Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein..*Nature.* 1996 Jan 25; 379(6563):364-8.

Patak E, Candenas ML, Pennefather JN, et al. Tachykinins and tachykinin receptors in human uterus. *Br J Pharmacol* 2003 Jun; 139(3):523-32.

Pekary AE, Lukaski HC, Mena I, Smith SM, Bhasin S, Hershman JM. Testosterone increases TRH biosynthesis in epididymis but not heart of zinc-deficient rats. *Peptides.* 1993 Mar-Apr; 14(2):315-24.

Pekary AE, Reeve JR Jr, Smith VP, Friedman S. In-vitro production of precursor peptides for thyrotropin-releasing hormone by human semen. *Int J Androl.* 1990 Jun; 13(3):169-79.

Pekary AE, Ross R, deKernion J, Hershman JM. Human reproductive tissues contain thyrotropin releasing hormone (TRH) and TRH-homologous peptides. *J Androl.* 1983 Nov-Dec; 4(6):408-14.

Penman E, Wass JA, Butler MG, Penny ES, Price J, Wu P, and Rees LH Distribution and characterisation of immunoreactive somatostatin in human gastrointestinal tract. *Regul Pept* 1983 Sep; 7(1):53-65.

Pennefather JN, Patak E, Pinto FM, et al. Mammalian tachykinins and uterine smooth muscle: the challenge escalates. *Eur J Pharmacol* 2004 Oct 1; 500(1-3):15-26.

Perloff WH, Steinberger E In vivo survival of spermatozoa in cervical mucus..*Am J Obstet Gynecol* 1964 Feb 15; 88:439-42.

Petersson F, Emons G, Hammar M. Testicular GnRH-receptors and direct effects of a GnRH-agonist on human testicular steroidogenesis. *Scand J Urol Nephrol* 1989; 23(3):161-4.

Petrie KA, Schmidt D, Bubser M, Fadel J, Carraway RE and Deutch AY. Neurotensin activates GABAergic interneurons in the prefrontal cortex, *J. Neurosci.* 2005 Feb 16; 25(7):1629-36.

Petrunkina AM, Friedrich J, Drommer W, Bicker G, Waberski D and Topfer-Petersen E, Kinetic characterisation of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells, *Reproduction* 2001 Sep;122(3):469-80.

Pfeffer J, Pang MG, Hoegerman SF, Osgood CJ, Stacey MW, Mayer J, Oehninger S, Kearns WG. Aneuploidy frequencies in semen fractions from ten oligoasthenoteratozoospermic patients donating sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1999 Sep; 72(3): 472 -8.

Pfleiderer G, Celliers PG. Isolation of an aminopeptidase from kidney particles. *Biochem Z.* 1963 Dec 3; 339:186-9.

Piessse C, Cadel S, Gouzy-Darmon C, Jeanny JC, Carrière V, Goidin D, Jonet L, Gourdji D, Cohen P, Foulon T. Expression of aminopeptidase B in the developing and adult rat retina *Exp Eye Res.* 2004 Nov;79(5):639-48.

Pintado CO, Pinto FM, Pennefather JN, et al. (2003) A role for tachykinins in female mouse and rat reproductive function. *Biol Reprod* 2003 Sep; 69(3):940-6.

Pintar JE, Schachter BS, Herman AB, Durgerian S, Krieger T. Characterization and localization of proopiomelanocortin messenger RNA in the adult rat testis. *Science.* 1984 Aug 10; 225(4662):632-4.

Pinto FM, Ravina CG, Subiran N, Cejudo-Román A, Fernández-Sánchez M, Irazusta J, Garrido N, Candenás L. Autocrine regulation of human sperm motility by tachykinins. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010 Aug 26; 8:104.

Plecas B, Popovic A, Jovovic D, and Hristic M. Mitotic activity and cell deletion in ventral prostate epithelium of intact and castrated oxytocin-treated rats. *J Endocrinol Invest* 1992 Apr; 15(4):249-53.

Polgár L The prolyl oligopeptidase family *Cell Mol Life Sci.* 2002 Feb; 59(2):349-62.  
Prado-Perez, E. Perez-Rivadeneira and F. Sanon-Julien, The impact of endometriosis on the rate of pregnancy of patients submitted to intrauterine insemination, *Fertil Steril* 2002; 77 S51.

Qi H, Moran MM, Navarro B, Chong JA, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Kirichok Y, Ramsey IS, Quill TA, Clapham DE. All four catSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 Jan; 104(4):1219-23.

Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE, Garbers DL. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 Dec; 100(25):14869-74.

Quill TA, Wang D, Garbers DL. Insights into sperm cell motility signaling through sNHE and the CatSper proteins. *Mol Cell Endocrinol.* 2006 May 16; 250(1-2):84-92.



Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril*. 1985 Oct; 44(4):493-8.

Quinn P, Kerin JF, and Warnes GM. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid *Fertil Steril*, 1985;44:493-98.

Rabinovici J, Jaffe RB Development and regulation of growth and differentiated function in human and subhuman primate fetal gonads..*Endocr Rev*. 1990 Nov; 11(4):532-57.

Raga F, Casan EM, Wen Y, Huang H and Polan ML, Independent regulation of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), TIMP-3 in human endometrial stromal cells by GnRH: implications in early human implantation, *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 1999 Feb; 84(2):636-42.

Raggenbass M. Overview of cellular electrophysiological actions of vasopressin. *Eur J Pharmacol*. 2008 Apr 7; 583(2-3):243-54. Epub 2008 Jan 30.

Ragni G, De Lauretis L, Bestetti O, Sghedoni D, Gambaro V. Gonadal function in male heroin and methadone addicts.*Int J Androl*. 1988 Apr;11(2):93-100.

Ragni G, Vegetti W, Baroni E, Colombo M, Arnoldi M and Lombroso G. Comparación of luteal phase profile in gonadotrophin stimulated cycles with or without a gonadotrophin-releasing hormona antagonist. *Hum Reprod* 2001 ;16(11):2258-62.

Ragoussis J, Senger G, Mockridge I, Sanseau P, Ruddy S, Dudley K, Sheer D and Trowsdale J A testis expressed zinc finger gene ZNF76 in human 6p21.3 centromeric to the MHC is closely linked to the human homologue of the t-complex gene Tc11. *Genomics* 1992 Nov; 14(3):673-9.

Ralt D, Goldenberg M, Fetterolf P, Thompson D, Dor J, Mashiach S, Garbers DL, Eisenbach M Sperm attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability.. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Apr 1; 88(7):2840-4.

Rannikki AS, Zhang FP, Huhtaniemi IT Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in the rat testis and ovary. *Mol Cell Endocrinol*. 1995 Feb; 107(2):199-208.

Ravina CG, Seda M, Pinto FM, Orea A, Fernández-Sánchez M, Pintado CO, Cadenas ML. A role for tachykinins in the regulation of human sperm motility. *Hum Reprod*. 2007 Jun; 22(6):1617-25.

Ravnik SE, Zarutskie PW, Muller CH Purification and characterization of a human follicular fluid lipid transfer protein that stimulates human sperm capacitation. *Biol Reprod*. 1992 Dec; 47(6):1126-33.

Rawlings ND, Barrett AJ MEROPS: the peptidase database..*Nucleic Acids Res*. 1999 Jan 1; 27(1):325-31.

Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jan 1; 32(Database issue):D160-4.

Razak K, Newland AC. The significance of aminopeptidases and haematopoietic cell differentiation. *Blood Rev.* 1992 Dec; 6(4):243-50.

Retamal C, Urzua J, Lorca C, Lopez ML, Alves EW. Changes in the plasma membrane proteins of stallion spermatozoa during maturation in the epididymis. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2000 Apr; 32(2):229-39.

Rhoades RA, Tanner GA *Fisiologia medica.* Edi Masson, Barcelona, 1995.

Ricci G, Perticarari S, Boscolo R, Montico M, Guaschino S, Presani G. Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient-density centrifugation technique. *Fertil Steril* 2009 Feb; 91(2):632-8.

Rich DH. Peptidase inhibitors.. In "Comprehensive Medicinal Chemistry. The Rational Design, Mechanistic Study and Therapeutic Application of Chemical Compounds", Vol.2, p.391. Sammes, P.G. y J.B. Taylor Eds. Pergamo Press, New York 1990.

Richardson SJ, Senikas V, Nelson JF. Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987 Dec; 65(6):1231-7.

Riemann D, Kehlen A, Langner J. CD13--not just a marker in leukemia typing. *Immunol Today.* 1999 Feb; 20(2):83-8.

Ritzén EM, Hagenäs L, Hansson V, Weddington SC, French FS, Nayfeh SN. Androgen binding and transport in testis and epididymis. *Vitam Horm.* 1975; 33:283-95.

Rives N, Saint Clair A, Mazurier S, Sibert L, Simeon N, Joly G, Mace B. Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males. *Hum Genet.* 1999 Sep; 105(3): 266 -72.

Rodriguez-Martinez H, Role of the oviduct in sperm capacitation, *Theriogenology* 2007 Sep 1; 68 Suppl 1:S138-46.

Ronquist G, Brody I, Gottfries A, Stegmayr B. An Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-stimulated adenosine triphosphatase in human prostatic fluid: part I. *Andrologia.* 1978 Jul-Aug; 10(4):261-72.

Ronquist G, Brody I, Gottfries A, Stegmayr B. An Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-stimulated adenosine triphosphatase in human prostatic fluid--part II. *Andrologia.* 1978 Nov-Dec; 10(6):427-33.

Ronquist G, Brody I. The prostasome: its secretion and function in man *Biochim Biophys Acta.* 1985 Sep 9; 822(2):203-18.

Rooney IA, Atkinson JP, Krul ES, Schonfeld G, Polakoski K, Saffitz JE, Morgan BP. Physiologic relevance of the membrane attack complex inhibitory protein CD59 in human seminal plasma: CD59 is present on extracellular organelles (prostasomes), binds cell membranes, and inhibits complement-mediated lysis. *J Exp Med* 1993 May 177 (5):1409-20.

Roques BP, Beaumont A. Neutral endopeptidase-24.11 inhibitors: from analgesics to antihypertensives? *Trends Pharmacol Sci.* 1990 Jun; 11(6):245-9.

Roques BP, Fournié-Zaluski MC, Soroca E, Lecomte JM, Malfroy B, Llorens C, Schwartz JC. The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice.. *Nature.* 1980 Nov 20; 288(5788):286-8.

Roques BP, Noble F, Daugé V, Fournié-Zaluski MC, Beaumont A. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1993 Mar; 45(1):87-146.

Roques BP, Noble F, Fournie-Zaluski MC. Endogenous opioid peptides and analgesia. Cambridge University Press, 1999.

Roques BP, Noble F. Dual inhibitors of enkephalin-degrading enzymes (neutral endopeptidase 24.11 and aminopeptidase N) as potential new medications in the management of pain and opioid addiction. *NIDA Res Monogr.* 1995; 147:104-45.

Rostène WH and Alexander MJ. Neurotensin and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol.* 1997 Apr; 18(2):115-73.

Rozengurt E, Sinnott-Smith J., Early signals underlying the induction of the c-fos and c-myc genes in quiescent fibroblasts: studies with bombesin and other growth factors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1988; 35:261-95.

Rubio C, Gil-Salom M, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Minguez Y, Remohi J, Pellicer A. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod.* 2001 Oct; 16(10): 2084 -92.

Russell DL, Robker RL. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex..*Hum Reprod Update.* 2007 May-Jun; 13(3):289-12.

Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. Mammalian spermatogenesis. in: Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Cleggs ED (eds.)*Histological and histopathological evaluation of the testis.* Clearwater: Cache River Press. 1990; 1-40.

Sadler TW Langman Embriología medica, cap 9 edit Panamericana, Madrid, 2004.

Saether T, Tran TN, Rootwelt H, Christophersen BO, Haugen TB. Expression and regulation of delta5-desaturase, delta6-desaturase, stearoyl-coenzyme A (CoA) desaturase 1, and stearoyl-CoA desaturase2 in rat testis *Biol Reprod.* 2003 Feb; 69(1):117-24.

Sakamoto H, Kawata M. Gastrin-releasing peptide system in the spinal cord controls male sexual behaviour. *J Neuroendocrinol.* 2009a Mar; 21(4):432-5.

Sakamoto H, Takanami K, Zuloaga DG, Matsuda K, Jordan CL, Breedlove SM, Kawata M. Androgen regulates the sexually dimorphic gastrin-releasing peptide system in the lumbar spinal cord that mediates male sexual function. *Endocrinology.* 2009b Aug; 150(8):3672-9.

Sakhel K, Schwarck S, Ashraf M and Abuzeid M, Semen parameters as determinants of success in 1662 cycles of intrauterine insemination after controlled ovarian hyperstimulation, *Fertil Steril* 84 (2005), pp. 248–249.

Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Alvarez JG, Thomas AJ Jr, Sharma RK. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertil Steril*. 2002 Aug; 78(2):313-8.

Sales N, Dutriez I, Maziere B, Ottaviani M, Roques BP. Neutral endopeptidase 24.11 in rat peripheral tissues: comparative localization by 'ex vivo' and 'in vitro' autoradiography. *Regul Pept*. 1991 Apr 5; 33(2):209-22.

San Augustin JT, Witman GB. Role of cAMP in the reactivation of demembrated ram spermatozoa. *Cell Motil Cytoskel*. 1994; 27(3):206-18.

Sanderink GJ, Artur Y, Schiele F, Gueguen R, Siest G. Alanine aminopeptidase in serum: biological variations and reference limits. *Clin Chem*. 1988 Jul; 34(7):1422-6.

Sano H, Feighner SD, Hreniuk DL, Iwaasa H, Sailer AW, Pan J, Reitman ML, Kanatani A, Howard AD, Tan CP. Characterization of the bombesin-like peptide receptor family in primates. *Genomics*. 2004 Jul; 84(1):139-46.

Santos AN, Langner J, Herrmann M, Riemann D. Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes. *Cell Immunol*. 2000 Apr 10; 201(1):22-32.

Saridogan E, Djahanbakhch O, Puddefoot JR, Demetroulis C, Collingwood K, Mehta JG, Vinson GP. Angiotensin II receptors and angiotensin II stimulation of ciliary activity in human fallopian tube. *J Clin Endocrinol Metab* 1996 Jul; 81(7):2719-25.

Sastry BV, Janson VE, Owens LK, Tayeb OS. Enkephalin- and substance P-like immunoreactivities of mammalian sperm and accessory sex glands. *Biochem Pharmacol*. 1982 Nov 1; 31(21):3519-22.

Sastry BV, Janson VE, Owens LK. Significance of substance P- and enkephalin-peptide systems in the male genital tract. *Ann NY Acad Sci* 1991; 632:339-53.

Sathananthan AH, Trounson AO. Ultrastructure of cortical granule release and zona interaction in monospermic and polyspermic human ova fertilized in Vitro. *Gamete Res* 6:225, 1982.

Sato Y, Suzuki N, Horita H, Wada H, Shibuya A, Adachi H, Tsukamoto T, Kumamoto Y, Yamamoto M. Effects of long-term psychological stress on sexual behavior and brain catecholamine levels. *J Androl* 1996 Mar-Apr; 17(2):83-90.

Schlingmann K, Michaut MA, Mcelwee JL, Wolff CA, Travis AJ and Turner RM. Calmodulin and CaMKII in the Sperm Principal Piece: Evidence for a Motility-Related Calcium/Calmodulin Pathway. *J Andrology*, 2007 Sep-Oct. 28(5):706-16

Schuel H, Burkman LJ. A tale of two cells: endocannabinoid-signaling regulates functions of neurons and sperm. *Biol Reprod*. 2005 Dec; 73(6):1078-86.

Schulz, B. Gerhartz, A. Neubauer, A. Holloschi, U. Heiser, M. Hafner and H.U. Demuth, Modulation of inositol 1,4,5-triphosphate concentration by prolyl endopeptidase inhibition, *Eur. J. Biochem.* **269** (2002), pp. 5813–5820.

Schwartz JC Metabolism of enkephalins and the inactivating neuropeptidase concept. *Trenes Neurosci.* 1983; 6:45-48.

Settlage DS, Motoshima M, Tredway DR Sperm transport from the external cervical os to the fallopian tubes in women: a time and quantitation study. *Fertil Steril* 1973 Sep; 24(9):655-61.

Shabanowitz RB, O'Rand MG Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs. *J Reprod Fertil.* 1988 Jan; 82(1):151-61.

Shao C, Zhang F, Kemp MM, Lihardt RJ, Waisman DS and Head JF *et al.*, Crystallographic analysis of calcium-dependent heparin binding to annexin A2, *J Biol Chem* 2006 Oct 20; 281(42):31689-95.

Shapiro LH, Ashmun RA, Roberts WM, Look AT. Separate promoters control transcription of the human aminopeptidase N gene in myeloid and intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 1991 Jun 25; 266(18):11999-2007.

Sharp B, Pekary AE beta-Endorphin 61-91 and other beta-endorphin-immunoreactive peptides in human semen. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981 Mar; 52(3):586-8.

Sharpe RM, Fraser HM. hCG stimulation of testicular LHRH-like activity. *Nature* 1980 Oct 16; 287(5783):642-3.

Sharpe RM, Irvine DS. How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *BMJ.* 2004 Feb 21; 328(7437):447-51.

Sheiner EK, Sheiner E, Carel R, Potashnik G, Shoham-Vardi I Potential association between male infertility and occupational psychological stress. *J Occup Environ Med* 2002 Dec; 44(12):1093-9.

Shimada K, Takahashi M, Turner AJ, Tanzawa K. Rat endothelin-converting enzyme-1 forms a dimer through Cys412 with a similar catalytic mechanism and a distinct substrate binding mechanism compared with neutral endopeptidase-24.11. *Biochem J.* 1996 May 1; 315 (Pt 3):863-7.

Shipp MA, Look AT. Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key! *Blood.* 1993 Aug 15; 82(4):1052-70.

Shipp MA, Tarr GE, Chen CY, Switzer SN, Hersh LB, Stein H, Sunday ME, Reinherz EL. CD10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Dec 1; 88(23):10662-6.

Shishido Y, Furushiro M, Tanabe S, Shibata S, Hashimoto S, Yokokura T. Effects of prolyl endopeptidase inhibitors and neuropeptides on delayed neuronal death in rats. *Eur J Pharmacol.* 1999 May 14;372(2):135-42.

Shupnik MA, Gonadotropin gene modulation by steroids and gonadotropin-releasing hormone, *Biol. Reprod.* 1996 Feb; 54(2):279-86.

Si Y, Okuno M. Role of tyrosine phosphorylation of flagellar proteins in hamster sperm hyperactivation. *Biol Reprod* 1999 Jul; 61(1):240-6.

Si Y, Olds-Clarke P. Evidence for the involvement of calmodulin in mouse sperm capacitation. *Biol Reprod.* 2000 May; 62(5):1231-9.

Siems WE, Maul B, Wiesner B, Becker M, Walther T, Rothe L, Winkler A. Effects of kinins on mammalian spermatozoa and the impact of peptidolytic enzymes. *Andrologia.* 2003 Feb; 35(1):44-54.

Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* 1990 Jul 19; 346(6281):240-4.

Sirinathsinghji DJ, Whittington PE, Audsley A, Fraser HM. beta-Endorphin regulates lordosis in female rats by modulating LH-RH release. *Nature.* 1983 Jan 6;301(5895):62-4.

Sjöström H, Norén O, Olsen J. Structure and function of aminopeptidase N. *Adv Exp Med Biol.* 2000;477:25-34.

Sobrero AJ, Macleod J. The immediate postcoital test. *Fertil Steril* 1962 Mar-Apr; 13:184-9.

Sokol RZ, Peterson M, Heber D, Swerdloff RS. Identification and partial characterization of gonadotropin-releasing hormone-like factors in human seminal plasma. *Biol Reprod* 1985 Sep; 33(2):370-4.

Sostaric E, Aalberts M, Gazella BM, Scout TA The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm *Anim Reprod Sci.* 2008 Sep; 107(3-4):237-48.

Soubeyrand S and Manjunath P, Novel seminal phospholipase A2 is inhibited by the major proteins of bovine seminal plasma, *Biochim Biophys Acta* 1997 Sep 5; 1341(2):183-8.

Sousa M, Mendoza C, Barros A, Tesarik J Calcium responses of human oocytes after intracytoplasmic injection of leukocytes, spermatocytes and round spermatids. *Mol Hum Reprod.* 1996 Nov; 2(11):853-7.

Spano M., Bonde J.P., Hjollund H.I., Kolstad H.A., Cordelli E., Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 2000 Jan; 73(1):43-50.

Spindel ER, Giladi E, Segerson TP, and Nagalla S Bombesin-like peptides: of ligands and receptors. *Recent Prog Horm Res* 1993; 48:365-91.

Sroga JM, Kalan A, Hade E, Kennard E and Friedman C. Site of semen collection and its effect on pregnancy rates in patients undergoing ovulation induction with gonadotropins *Fertil Steril Suppl* 2008 Sep 90(1):S361.

Stauss CR, Votta TJ, Suarez SS. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol Reprod* 1995 Dec; 53(6):1280-5.

Steures P, van der Steeg JW, Hompes PG, Bossuyt PM, Habbema JD, Eijkemans MJ, Schöls WA, Burggraaff JM, van der Veen F, Mol BW; CECERM (Collaborative Effort for Clinical Evaluation in Reproductive Medicine) Effectiveness of intrauterine insemination in subfertile couples with an isolated cervical factor: a randomized clinical trial. *Fertil Steril*. 2007 Dec; 88(6):1692-6.

St-Gelais F, Jomphe C and Trudeau LE, The role of neurotensin in central nervous system pathophysiology: what is the evidence? *J. Psychiat. Neurosci.* 2006 Jul; 31(4):229-45.

Stojilkovic SS, Reinhart J, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocr Rev.* 1994 Aug; 15(4):462-99.

Stolakis V, Kalafatakis K, Botis J, Zarros A, Liapi C The regulatory role of neurotensin on the hypothalamic-anterior pituitary axons: emphasis on the control of thyroid-related functions *Neuropeptides*. 2010 Feb; 44(1):1-7.

Stone BA, Vargyas JM, Ringler GE, Stein AL, Marrs RP. Determinants of the outcome of intrauterine insemination: Analysis of outcomes of 9963 consecutive cycles. *Am J Obstet Gynecol.* 1999 Jun; 180(6 Pt 1):1522-34.

Suarez SS and Osman RA, Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract, *Biol Reprod* 1987 Jun; 36(5):1191-8.

Suarez SS, Dai X. Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biol Reprod* 1992 Apr; 46(4):686-91.

Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update* 2006 Jan-Feb; 12(1):23-37.

Suarez SS, Vincenti L, Ceglia MW. Hyperactivated motility induced in mouse sperm by calcium ionophore A23187 is reversible. *J Exp Zool.* 1987 Nov; 244(2): 331 -36.

Subirán N, Agirregoitia E, Valdivia A, Ochoa C, Casis L, Irazusta J. Expression of enkephalin-degrading enzymes in human semen and implications for sperm motility. *Fertil Steril*. 2008 May; 89(5 Suppl):1571-7. Epub 2007 Oct 22.

Subramanyam M, Gutheil WG, Bachovchin WW, Huber BT. Mechanism of HIV-1 Tat induced inhibition of antigen-specific T cell responsiveness. *J Immunol.* 1993 Mar 15; 150(6):2544-53.

Sullivan R, Frenette G, Girouard J Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl* 2007; 9(4):483-91.

Sullivan R, Saez F, Girouard J, Frenette G. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis* 2005 Jul-Aug; 35(1):1-10.

Sumitomo M, Iwase A, Zheng R, Navarro D, Kaminetzky D, Shen R, Georgescu MM, Nanus DM. Synergy in tumor suppression by direct interaction of neutral endopeptidase with PTEN. *Cancer Cell*. 2004 Jan; 5(1):67-78.

Sumitomo M, Shen R, Nanus DM. Involvement of neutral endopeptidase in neoplastic progression. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Aug 1; 1751(1):52-9.

Sunday ME, Kaplan LM, Motoyama E, Chin WW, Spindel ER. Gastrin-releasing peptide (mammalian bombesin) gene expression in health and disease. *Lab Invest*. 1988 Jul; 59(1):5-24.

Swann K. Soluble sperm factors and Ca<sup>2+</sup> release in eggs at fertilization. *Rev Reprod*. 1996 Jan; 1(1):33-9.

Szczepanska R. and Grupp L. A. Bestatin, an aminopeptidase B inhibitor, selectively reduces alcohol intake in rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 1993 Apr; 17(2):434-7.

Szeltner Z, Polgár L. Structure, function and biological relevance of prolyl oligopeptidase. *Curr Protein Pept Sci*. 2008 Feb; 9(1):96-107.

Takemura M, Kimura T, Nomura S, Makino Y, Inoue T, Kikuchi T, Kubota Y, Tokugawa Y, Nobunaga T, Kamiura S, Onoue H, Azuma C, Saji F, Kitamura Y, and Tanizawa O. Expression and localization of human oxytocin receptor mRNA and its protein in chorion and decidua during parturition. *J Clin Invest* 1994 Jun; 93(6):2319-23.

Takemura M, Nomura S, Kimura T, Inoue T, Onoue H, Azuma C, Saji F, Kitamura Y, and Tanizawa O. Expression and localization of oxytocin receptor gene in human uterine endometrium in relation to the menstrual cycle. *Endocrinology* 1993 Apr; 132(4):1830-5.

Talbot P. Sperm penetration through oocyte investments in mammals. *Am J Anat*. 1985 Nov; 174(3):331-46.

Tam LT, Engelbrecht S, Talent JM, Gracy RW, Erdös EG. The importance of disulfide bridges in human endopeptidase (enkephalinase) after proteolytic cleavage. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985 Dec 31; 133(3):1187-92.

Tanioka T, Hattori A, Masuda S, Nomura Y, Nakayama H, Mizutani S, Tsujimoto M. Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase. The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases. *J Biol Chem*. 2003 Aug 22; 278(34):32275-83.

Tanoue A. New Topics in Vasopressin Receptors and Approach to Novel Drugs: Effects of Vasopressin Receptor on Regulations of Hormone Secretion and Metabolisms of Glucose, Fat, and Protein. *J Pharmacol Sci*. 2009 Jan; 109 (1):50-2.



- Tapanainen JS, Aittomäki K, Min J, Vaskivuo T, Huhtaniemi IT. Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nat Genet.* 1997 Feb; 15(2):205-6.
- Tash JS, Bracho GE. Regulation of sperm motility: emerging evidence for a major role for protein phosphatases. *J Androl* 1994 Nov-Dec; 15(6):505-9.
- Tash JS, Means AR. Ca<sup>2+</sup> regulation of sperm axonemal motility. *Methods Enzymol.* 1987; 139: 808 -23.
- Tash JS, Means AR. Cyclic adenosine 3',5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol Reprod.* 1983 Feb; 28(1):75-104.
- Tash JS, Means AR. Regulation of protein phosphorylation and motility of sperm by cyclic adenosine monophosphate and calcium. *Biol Reprod.* 1982 May; 26(4):745-63.
- Taupenot L., Harper K. L. and O'Connor D. T. The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med.* 2003 Mar 20; 348(12):1134-49.
- Taylor A Aminopeptidases: towards a mechanism of action.. *Trends Biochem Sci.* 1993 May; 18(5):167-71.
- Taylor CT, Lawrence YM, Kingsland CR, Biljan MM, Cuthbertson KS Oscillations in intracellular free calcium induced by spermatozoa in human oocytes at fertilization. *Hum Reprod.* 1993 Dec; 8(12):2174-9.
- Thomas PG, Ball BA, Miller PG, Brinsko SP and Southwood, L A subpopulation of morphologically normal, motile spermatozoa attach to equine oviductal epithelial cell monolayers, *Biol Reprod* 1994 Aug; 51(2):303-9.
- Tiruppathi C, Miyamoto Y, Ganapathy V, Roesel RA, Whitford GM, Leibach FH. Hydrolysis and transport of proline-containing peptides in renal brush-border membrane vesicles from dipeptidyl peptidase IV-positive and dipeptidyl peptidase IV-negative rat strains. *J Biol Chem.* 1990 Jan 25; 265(3):1476-83.
- Togo T, Morisawa M GPI-anchored aminopeptidase is involved in the acrosome reaction in sperm of the mussel *Mytilus edulis*. *Mol Reprod Dev.* 2004 Apr; 67(4):465-71.
- Togo T, Morisawa M. Aminopeptidase-like protease released from oocytes affects oocyte surfaces and suppresses the acrosome reaction in establishment of polyspermy block in oocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev Biol.* 1997 Feb 15; 182(2):219-27.
- Tomlinson MJ, Amisshah-Arthur JB, Thompson KA, Kasraie JL, Bentick B. Prognostic indicators for intrauterine insemination (IUI): statistical model for IUI success. *Hum Reprod* 1996 Sep; 11(9):1892-6.
- Tomlinson MT, Kessopoulou E and Barratt CL, The diagnostic and prognostic value of traditional semen parameters, *J Androl.* 1999 Sep-Oct; 20(5):588-93.
- Toshimori K, Higashi R, Oura C. Distribution of intramembranous particles and filipin-sterol complexes in mouse sperm membranes: polyene antibiotic filipin treatment. *Am J Anat* 1985 Dec; 174(4):455-70.

Traurig HH, Saria A, Lembeck F. (1984) Substance P in primary afferent neurons of the female rat reproductive system. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1984 Jul; 326(4):343-6.

Trindade PT, Rouleau JL. Vasopeptidase inhibitors: potential role in the treatment of heart failure. *Heart Fail Monit.* 2001; 2(1):2-7.

Tsong SD, Phillips D, Halmi N, Liotta AS, Margioris A, Bardin CW, Krieger DT. ACTH and beta-endorphin-related peptides are present in multiple sites in the reproductive tract of the male rat. *Endocrinology.* 1982 Jun; 110(6):2204-6.

Tsuru D, Sakabe K, Yoshimoto T, Fujiwara K. Pyroglutamyl peptidase from chicken liver: purification and some properties. *J Pharmacobiodyn.* 1982 Nov; 5(11):859-68.

Tsutsui K, Bentley GE, Bedecarrats G, T Osugi, T Ubuka, Kriegsfeld LJ. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its control of central and peripheral reproductive function. *Front Neuroendocrinol.* 2010 Jul; 31(3):284-95.

Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, Teranishi H, Fujisawa Y, Kikuchi M, Ishii S, Sharp PJ. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 Aug 28; 275(2):661-7.

Turner AJ. Processing and metabolism of neuropeptides. *Essays Biochem.* 1986; 22:69-119.

Turner AJ, Isaac RE, Coates D. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bioessays.* 2001 Mar; 23(3):261-9.

Turner RM. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev.* 2006; 18(1-2):25-38.

Ulisse S, Fabbri A, Dufau ML. Corticotropin-releasing factor receptors and actions in rat Leydig cells. *J Biol Chem.* 1989 Feb 5; 264(4):2156-63.

Ulisse S, Fabbri A, Tinajero JC, Dufau ML. A novel mechanism of action of corticotrophin releasing factor in rat Leydig cells. *J Biol Chem.* 1990 Feb 5; 265(4):1964-71.

Umezawa Y, Yokoyama K, Kikuchi Y, Date M, Ito K, Yoshimoto T, Matsui H. Novel prolyl tri/tetra-peptidyl aminopeptidase from *Streptomyces mobaraensis*: substrate specificity and enzyme gene cloning. *J Biochem.* 2004 Sep; 136(3):293-300.

Ushijima C, Kumasako Y, Kihale PE, Hirotsuru K, Utsunomiya T. Analysis of chromosomal abnormalities in human spermatozoa using multi-colour fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod.* 2000 May; 15(5):1107-11.

Utlegh AG, Yi EC, Xie T, Shannon P, White JT, Goodlett DR, Hood L, Lin B.. Proteomic analysis of human prostasomes. *Prostate.* 2003 Jul 1; 56(2):150-61.

Valdivia A, Irazusta J, Fernandez D, Mugica J, Ochoa C, Casis L. Pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase in human semen: increased activity in necrozoospermia. *Regulatory peptides* 2004 Oct; 122(2): 79-84.

van Biljon W, Wykes S, Scherer S, Krawetz SA and Hapgood J, Type II gonadotropin-releasing hormone receptor transcripts in human sperm, *Biol. Reprod.* 2002 Dec; 67(6):1741-9.

van der Westerlaken LA, Naaktgeboren N, Helmerhorst FM. Evaluation of pregnancy rates after intrauterine insemination according to indication, age, and sperm parameters. *J Assist Reprod Genet.* 1998 Jul; 15(6):359-64.

van Rumste MM, Custers IM, van der Veen F, van Wely M, Evers JL, Mol BW. The influence of the number of follicles on pregnancy rates in intrauterine insemination with ovarian stimulation: a meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2008 Nov-Dec; 14(6):563-70.

Vanha-Perttula T. Aminoacyl and dipeptidyl arylamidases (aminopeptidases) of the pituitary gland as related to function. *Endocrinology.* 1969 Dec; 85(6):1062-9.

Varagic J, Frohlich ED. Local cardiac renin-angiotensin system: hypertension and cardiac failure. *J Mol Cell Cardiol* 2002 Nov; 34(11):1435-42.

Varona A, Blanco L, LÃ³pez JI, Gil J, Agirregoitia E, Irazusta J, Larrinaga G. Altered levels of acid, basic, and neutral peptidase activity and expression in human clear cell renal cell carcinoma. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007 Feb; 292(2):F780-8.

Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, Liebaers I, Van Steirteghem A. Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod.* 2000 Feb; 15(2): 351 -65.

Villeneuve P, Feliciangeli S, Croissandeau G, Seidah NG, Mbikay M, Kitabgi P, Beaudet A. Altered processing of the neurotensin/neuromedin N precursor in PC2 knock down mice. a biochemical and immunohistochemical study, *J. Neurochem.* 2002 Aug; 82(4):783-93.

Vincent B, Vincent JP and Checler F, Neurotensin and neuromedin N undergo distinct catabolic processes in murine astrocytes and primary cultured neurons, *Eur. J. Biochem* 1994 Apr;221(1):297-306.

Vinson GP, Ho MM The adrenal renin/angiotensin system in the rat. *Horm Metab* 1998 Jun-Jul; 30(6-7):355-9.

Vinson GP, Puddefoot JR, Ho MM, Barker S, Mehta J, Saridogan E and Djahanbakhch O Type 1 angiotensin II receptors in rat and human sperm. *J Endocrinol.* 1995 Feb; 144(2):369-78.

Visconti P, Johnson L, Oyaski M, Fornes M, Moss S, Gerton G, Kopf G. Regulation, localization and anchoring of protein kinase A subunits during mouse sperm capacitation. *Dev Biol.* 1997 Dec 15; 192(2):351-63.

Vlahos NF, Coker L, Lawler C, Zhao Y, Bankowski B, Wallach EE. Women with ovulatory dysfunction undergoing ovarian stimulation with clomiphene citrate for intrauterine insemination may benefit from administration of human chorionic gonadotrophin *Fertil Steril*, 2005 May; 83(5):1510-6.

Wada E, J Camino, Lebacqz Verheyden - AM, y Battey JF. Neuromedin B and gastrin-releasing peptide mRNAs are differentially distributed in the rat nervous system. *J Neurosci* 1990 Sep;10(9):2917-30.

Wagner GW, Tavianini MA, Herrmann KM, Dixon JE. Purification and characterization of an enkephalin aminopeptidase from rat brain. *Biochemistry*. 1981 Jun 23; 20(13):3884-90.

Wainer R, Albert M, Dorion A, Bailly M, Bergere M and Lombroso R et al., Influence of the number of motile spermatozoa inseminated and their morphology on the success of intra-uterine insemination, *Hum Reprod* 2004 Sep;19(9):2060-5.

Waksman G, Hamel E, Delay-Goyet P, Roques BP. Neuronal localization of the neutral endopeptidase 'enkephalinase' in rat brain revealed by lesions and autoradiography. *EMBO J*. 1986 Dec 1; 5(12):3163-6.

Walter R, Shlank H, Glass JD, Schwartz IL and Kerenyi TD, Leucylglycinamide released from oxytocin by human uterine enzyme, *Science*. 1971 Aug 27; 173(999):827-9.

Wang D, King SM, Quill TA, Doolittle LK, Garbers DL. A new sperm-specific Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger required for sperm motility and fertility. *Nat Cell Biol*. 2003 Dec; 5(12):1117-22.

Wang LH, Battey JF, Wada E, Lin JT, Mantey S, Coy DH, Jensen RT. Activation of neuromedin B-preferring bombesin receptors on rat glioblastoma C-6 cells increases cellular Ca<sup>2+</sup> and phosphoinositides. *Biochem J*. 1992 Sep 1; 286 (Pt 2):641-8.

Wang XF, Zhou CX, Shi QI, Yuan YY, Yu MK and Ajonuma L et al., Involvement of CFTR in uterine bicarbonate secretion and the fertilizing capacity of sperm, *Nature Cell Biol* 2003 Oct; 5(10):902-6.

Ward CR, Storey BT, Kopf GS. Selective activation of Gi1 and Gi2 in mouse sperm by the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J Biol Chem*. 1994 May 6; 269(18):13254-8.

Wassarman PM. Mouse gamete adhesion molecules. *Biol Reprod* 1992 Feb; 46(2):186-91.

Watt VM, Willard HF. The human aminopeptidase N gene: isolation, chromosome localization, and DNA polymorphism analysis. *Hum Genet*. 1990 Oct; 85(6):651-4.

Weihofen WA, Liu J, Reutter W, Saenger W, Fan H. Crystal structure of CD26/dipeptidyl-peptidase IV en el complejo con adenosina deaminasa revela una interfaz muy anfífilas. *J Biol Chem*. 2004 Oct 8; 279 (41):43330-5.

Weinbauer GF, Gromoll J, Simini M, Nieschlag R. Physiology of testicular function. Nieschlag E, Behre HM, eds, Springer, Berlin Heidelberg New York 26-57, 1997

Welches WR, Santos RA, Chappell MC, Brosnihan KB, Greene LJ, Ferrario CM. Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin. *J Hypertens*. 1991 Jul; 9(7):631-8.

Wen XH, Yang ZW. Quantitative (stereological) study on the spermatozoal storage capacity of epididymis in rats and monkeys. *Asian J Androl.* 2000 Mar; 2(1):73-7.

Wesley UV, Albino AP, Tiwari S, Houghton AN. A role for dipeptidyl peptidase IV in suppressing the malignant phenotype of melanocytic cells. *J Exp Med.* 1999 Aug 2; 190(3):311-22.

White DR, Aitken RJ. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Res.* 1989 Feb; 22(2): 163 -177.

Whitelaw PF, Eidne KA, Sellar R, Smyth CD and Hillier SG, Gonadotropin-releasing hormone receptor ribonucleic acid expression in rat ovary, *Endocrinology* 1995 Jan; 136(1):172-9.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004 May; 27(5) 1047-53.

Wilk S. and Healy D. Glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A), the BP1/6C3 antigen. *Adv. Neuroimmunol* 1993; 3:195-207.

Wilkes MM, Yen SS Augmentation by naloxone of efflux of LRF from superfused medial basal hypothalamus. *Life Sci.* 1981 May 21; 28(21):2355-9.

Williams AC, Ford WC. The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. *J Androl.* 2001 Jul-Aug; 22(4):680-95.

Williams M, Hill CJ, Scudamore I, Dunphy B, Cooke ID, Barratt CL Sperm numbers and distribution within the human fallopian tube around ovulation. *Hum Reprod* 1993 Dec; 8(12):2019-26.

Williams RS, Eames M, Ryves WJ, Viggars J and Harwood AJ, Loss of a prolyl oligopeptidase confers resistance to lithium by elevation of inositol (1,4,5) trisphosphate, *Embo J.* 18 (1999), pp. 2734-2745.

Wisner A, Dufour E, Messaoudi M, Nejd A, Marcel A, Ungeheuer MN, Rougeot C. Human Opiorphin, a natural antinociceptive modulator of opioid-dependent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Nov 21; 103(47):17979-84.

World Health Organization; WHO, Laboratory Manual for the Examination of human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction (4th ed.), Cambridge University Press, Cambridge, UK (1999).

Wu C, Stojanov T, Chami O, Ishii S, Shimizu T, Li A, O'Neill C. Evidence for the autocrine induction of capacitation of mammalian spermatozoa. *J Biol Chem.* 2001 Jul 20; 276(29):26962-8.

Wuttke MS, Buck J, Levin LR. Bicarbonate-regulated soluble adenylyl cyclase. *Jop.* 2001 Jul; 2(4 Suppl):154-8.

Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, Glaser RL, Pearson FS, Evenson D Advancing age in healthy men has differential effects on DNA strand damage, chromatin integrity, gene mutations, aneuploidies and diploidies in sperm, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jun 20; 103(25):9601-6.

Xia J, Reigada D, Mitchell CH, Ren D. Catsper channel-mediated  $Ca^{2+}$  entry into mouse sperm triggers a tail-to-head propagation. *Biol Reprod* 2007 Sep; 77(3):551-9.

Xie F, Garcia MA, Carlson AE, Schuh SM, Babcock DF, Jaiswal BS, Gossen JA, Esposito G, van Duin M, Conti M. Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Dev Biol* 2006 Aug 15; 296(2):353-62.

Xu Y, Wellner D, Scheinberg DA. Substance P and bradykinin are natural inhibitors of CD13/aminopeptidase N. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Mar 17; 208(2):664-74.

Yanagimachi R. Capacitacion and the acrosome reaction. En: Asch R, Balmaceda JP, Johnston I, eds. *Gamete Physiology*. Serono Symposia. Norewell, Massachussets; 31, 1990.

Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, & Neill JD, eds. *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed. New York: Raven Press; 1994; 189 -317.

Yanagimachi R. The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J Reprod Fertil* 1970 Oct; 23:193-6.

Yasothornsrikul S., Aaron W., Toneff T. and Hook V. Y. H. Evidence for the proenkephalin processing enzyme prohormone thiol protease (PTP) as a multicatalytic cysteine protease complex: activation by glutathione localized to secretory vesicles. *Biochemistry*. 1999 Jun 8; 38(23):7421-30.

Yasothornsrikul S., Greenbaum D., Medzihradzky K. F. et al. Cathepsin L in secretory vesicles functions as a prohormone-processing enzyme for production of the enkephalin peptide neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Aug 5; 100(16):9590-5.

Yavas Y, Selub MR. Intrauterine insemination (IUI) pregnancy outcome is enhanced by shorter intervals from semen collection to sperm wash, from sperm wash to IUI time, and from semen collection to IUI time. *Fertil Steril*. 2004 Dec; 82(6):1638-47.

Yeager CL, Ashmun RA, Williams RK, Cardellichio CB, Shapiro LH, Look AT, Holmes KV. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature*. 1992 Jun 4; 357(6377):420-2.

Yin H, Ukena K, Ubuka T, Tsutsui K A novel G protein-coupled receptor for gonadotropin-inhibitory hormone in the Japanese quail (*Coturnix japonica*): Identification, expression and binding activity. *J Endocrinol* 2005 Jan; 184(1):257-66.

Ying SY, Ling N, Bohlen P, Guillemin R. Gonadocrinins: peptides in ovarian follicular fluid stimulating the secretion of pituitary gonadotropins. *Endocrinology* 1981 Apr; 108(4):1206-15.

Yoshikawa K, Aizawa T. Expression of the enkephalin precursor gene in rat Sertoli cells. Regulation by follicle-stimulating hormone. *FEBS Lett*. 1988 Sep 12; 237(1-2):183-6.

Yoshikawa K, Maruyama K, Aizawa T, Yamamoto A. A new species of enkephalin precursor mRNA with a distinct 5'-untranslated region in haploid germ cells. *FEBS Lett.* 1989 Mar 27; 246(1-2):193-6.

Yoshimura Y Wallach EE. Studies on the mechanism(s) of mammalian ovulation *Fertil Steril* 1987 Jan; 47(1):22-4.

Yoshimura Y, Santulli R, Atlas SJ, Fujii S, Wallach EE. The effects of proteolytic enzymes on in Vitro ovulation in the rabbit. *Am J Obstet Gynecol* 1987 Aug; 157(2):468-75.

Yu DM, Wang XM, McCaughan GW, Gorrell MD. Extraenzymatic functions of the dipeptidyl peptidase IV-related proteins DP8 and DP9 in cell adhesion, migration and apoptosis. *FEBS J.* 2006 Jun; 273(11):2447-60.

Yudin AI, Hanson FW, Katz DF. Human cervical mucus and its interaction with sperm: a fine-structural view. *Biol Reprod.* 1989 Mar; 40(3):661-71.

Zahm DS, Grosu S, Williams EA, Qin S and Béroud A, Neurons of origin of the neurotensinergic plexus enmeshing the ventral tegmental area in rat: retrograde labeling and in situ hybridization combined, *Neuroscience* 2001;104(3):841-51.

Zaneveld LJ, De Jonge CJ, Anderson RA, Mack SR Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod.* 1991 Oct; 6(9):1265-74.

Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Vanderpoel S; International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology; World Health Organization. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertil Steril.* 2009 Nov; 92(5):1520-4.

Zeleznik AJ The physiology of follicle selection. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004 Jun; 16:2-31.

Zeyneloglu HB, Arici A, Olive DL and Duleba AJ, Comparison of intrauterine insemination with timed intercourse in superovulated cycles with gonadotropins: a meta-analysis, *Fertil Steril* 1998 Mar;69(3):486-91.

Zheng XY, Chen GA and Wang HY, Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human endometrium, *Human Reprod* 2004 Dec; 19(12):2933-41.

Zhou ZF, Xiao BL, Zhang GY, Zhuang LZ. A study of the effect of B-EP and naloxone on the function of the hypothalamo-pituitary-testicular axis of the rat. *J Androl.* 1990 May- Jun; 11(3):233-9.

Zini S., Fournie-Zaluski M. C., Chauvel E., Roques B. P., Corvol P. and Llorens-Cortes C. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 15; 93(21):11968-73.

Zorgniotti AW, Sealfon AI, Toth A. Chronic scrotal hypothermia as a treatment for poor semen quality. *Lancet* 1980 Apr 26; 1(8174):904-6.

Zorn B, Vidmar G, Meden-Vrtovec H. Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Int J Androl*. 2003 Oct; 26(5):279-85.



