



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

# I. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2015eko maiatzaren 13, 14 eta 15  
Durango, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

## OSASUNA

**Beta-endorfinaren eragina giza  
espermatozoiden erreakzio  
akrosomikoan**

*I. Urizar, I. Muñoa, I. Estonba,  
M. Gianzo, J. Irazusta eta N. Subirán*

703-709 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.97>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



eman ta zabal zazu



LAGUNTZAILEAK:



## Beta-endorfinaren eragina giza espermatozoideen erreakzio akrosomikoan

Urizar, I<sup>1</sup>; Muñoa, I<sup>1</sup>; Estonba, I<sup>1</sup>; Gianzo, M<sup>1</sup>; Irazusta, J<sup>1</sup> eta Subirán, N<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidad del País Vasco/ Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

[itziar.urizara@ehu.es](mailto:itziar.urizara@ehu.es)

### Laburpena

Ejakulatu berri diren giza espermatozoideak ez dira obozito bat *in vivo* nahiz *in vitro* ernaltzeko gai. Hori dela eta, emakumearen ugaltze traktuan daudenean, modu sekuentzialean, mugitzeko ahalmena, kapazitazioa eta hiperaktibazioa eta erreakzio akrosomikoa garatu behar dituzte. Espermatozoidearen eta ingurumenaren artean gertatzen diren elkarrekintzen bitartekariak diren zenbait seinalizazio-bide deskribatu dira, eta horietako bat, sistema opioidea da. Beta-endorfina, gizonezkoen zein emakumezkoen ugaltzetraktuan dagoen peptido opioidea da eta dirudienez gizonezkoetan funtzio espermatikoa erregulatzen dihardu. Dena den, gaur egun arte, guztiz ezezaguna da sistema opioideak erreakzio akrosomikoan betetzen duen funtzioa eta horregatik lan honen helburua hori aztertzea izan da. Ikerketa hau, gizonezkoen antisorgailuen garapenean zein lagunduriko ugalketan tresna erabilgarria izan daiteke.

**Hitz gakoak:** Sistema opioidea, ugalkortasuna, erreakzio akrosomikoa, beta-endorfina.

### Abstract

*Ejaculated sperm cells are immature and infertile and must undergo many modifications to become fertilization competent. These sperm modifications include different processes in the female reproductive tract, such as activation of sperm motility, capacitation and hiperactivation and acrosome reaction. Different intracelular pathways mediate the interactions between the sperm and its environment and the opioid system has an important role on it. Beta-endorphin is an endogenous opioid peptide, which is found in the male and female reproductive tracts and is seem to regulate the sperm pysiology. Until the day, is totally unknown the function that the opioid system plays in the acrosome reaction, so the principal objective is to investigate it. This research can represent an opportunity for reproductive management, for either in the development of novel targeted contraceptives or in assisted reproduction.*

**Keywords:** Opioid system, fertility, acrosome reaction, beta-endorphin.

## 1. Sarrera eta motibazioa

Gaur egun, 80 milioi pertsona inguruk daukate ugalkortasunarekin erlazionatutako arazoren bat. Honen arrazoiak ugariak izan daitezke, baina hiru kasutatik batean arazoa gizonezkoetan gertatzen dela uste da<sup>1</sup>. Espermatogenesisian gertatzen diren akatsak direla eta, espermatozoide ez funtzional edo kalitate baxukoak sortzen dira eta horrek ugalkortasunean arazoak dakartza, espezieen iraungipenean zuzenean eraginez. Espermatozoideak gizonezkoen zelula germinalak dira eta hauen funtzio nagusia obozitoa ernaltzearena da, zigotoa deritzon zelula totipotentea sortzeko eta hortik aurrera gizabanako oso bat eratu ahal izateko. Espermatogenesisian sortutako espermatozoideak ez dira gai *in vivo* nahiz *in vitro* ernaltzeko, eta horregatik ezin dute ernalketaren prestakuntza garatu. Isuriak izan diren espermatozoideak, eraldaketa morfologikoa jasan arren, emakumezkoen ugaltze traktuan gertatzen diren aldaketa fisiologiko eta biokimikoak ere jasan behar dituzte. Modu sekuentzialean, espermatozoideek mugitzeko ahalmena, kapazitazioa eta hiperaktibazioa garatu behar dituzte, eta behin obozitoarekin kontaktuan daudenean, erreakzio akrosomikoa jasan behar dute, honen barrura sartu ahal izateko eta zigotoa eratzeke (Flesh eta Gadella, 2000).

Lehenik eta behin espermatozoideek mugitzeko ahalmena garatu behar dute. Mugikortasuna nahitaezko ezaugarria da ernalkuntza gertatzeko. Izan ere, testikuluetatik eratorriak diren espermatozoideak zelula oso espezializatuak izan arren, oraindik ez dira obulua ernaltzeko gai. Honen arazoa dakartzaten mugikortasun nulua edo oso ahula izan daiteke, mintz plasmatikoaren heltzea osatua ez dagoelako. Alde batetik, mugikortasun aktiboa daukaten espermatozoideak daude eta horiek

<sup>1</sup> (<http://www.who.int/reproductive-health/infertility/report.pdf>).

bide simetrikoak eta progresiboak egiten dituzte espermatozoidea zuzenki bideratuz oso biskosoak ez diren medioetan barrena (Turner, 2006). Beste aldetik, hiperaktibazioa pairatzen duten espermatozoideak daude. Horiek mugikortasun hiperaktiboa daukate. Prozesu hori kapazitazioarekin batera gertatzen da eta ernalketarako prozesu kritikoa dela onartzen da.

### Kapazitazioa

Behin, espermatozoideak mugitzeko ahalmena garatu duela, kapazitazioa izeneko prozesua gertatzen da. Lehen aldiz, era independentean, Austinek (1952) eta Changek (1951) deskribatu zuten. Prozesu itzulgarria da, espermatozoideari lotuta dauden faktoreen desagerpenarekin hasten dena. Faktore hauek plasma seminaletik eratorriak dira eta kapazitazioa bukatutzat ematen da espermatozoidea, obuluaren *Zona Pelluzida*-ren estimuluei erantzuteko gai denean. Hori gertatu ondoren, espermatozoidea prest dago erreakzio akrosomikoa jasateko. Kapazitazioan zehar, espermatozoidearen mintz plasmaticoak aldaketa biokimikoak jasaten ditu (Yanagimachi, 1994). Hauen artean aipa daitezke, gainazal zelularrean dauden molekulen berrantolatatu, mintz plasmaticoaren desantolaketa eta hiperaktibazio espermaticoak. Era horretan, espermatozoidea erreakzio akrosomikoa jasateko prestatzen da (Visconti et al, 2002).

### Erreakzio Akrosomikoa

*In vivo*, kapazitazioa eta gero gertatzen den prozesu bat da eta espermatozoidearen mintz plasmaticoaren eta kanpo-mintz akrosomalaren arteko fusioaren ondoriozko exozitosian datza. Azkenik barne-mintz akrosomala agerian geratzen da (Patrat et al, 2000). Akrosoman dauden entzimak askatzen dira eta horiek ahalbidetzen dute espermatozoidea granulosaren zelulen artean zeharkatzea. Espermatozoideak obuluaren *Zona Pelluzida*ra elkartzen direnean (ZP3 proteinei esker), akrosomaren kanpo-mintza erabat disolbatu, akrosomaren barneko osagaiak askatu eta horrek espermatozoidea *Zona Pelluzida* zeharkatzea ahalbidetzen du.

Progesterona, ZP3, prostaglandinak, esterolaren sulfatoak, glukosaminglikanoak, besteak beste, erreakzio akrosomikoaren inductoreak dira eta folikuluaren fluidoetan zein *cumulus oophorus* zeluletan aurkitu daitezke. Aipatzekoa da, badaudela inductore sintetiko edo artifizialak: kaltzioaren ionoforoak, lektinak edota neoglikoproteinak (A. Abou-haila et al, 2009).

Erreakzio akrosomikoa zelulako seinalizazio bidekonplexuek bideratzen dute: proteina kinasen aktibazioa eta euren ondoriozko proteina intrazelularren fosforilazioa eta kanal ionikoen aktibazioa (Breitbart et al, 2002; Herrick et al, 2005). Izan ere zitosolean dagoen kaltzioaren kontzentrazioaren igoera nahitaezkoa eta beharrezkoa da akrosomaren exozitosisa eta erreakzio akrosomikoa gertatzeko (Patrat et al, 2000). Kaltzioaren igoera hori zenbait eratarik gerta daiteke: zelula kanpotik kanaleen bidez sartuta, organuluetan gordeta zegoen kaltzioaren mobilizazioa (akrosomatik edota mitokondriatik)... etab. Beraz, esan daiteke kaltzioa exozitosis akrosomalaren erregulatu nagusia dela (Publicover eta Barrat, 1999; Darszon et al, 2001; Lishko et al, 2011).

### Gametoen mintzen fusioa

Behin espermatozoideak erreakzio akrosomikoa jasan eta *Zona Pelluzida* zeharkatu duela, bi mintz plasmaticoen arteko elkarrekintza gertatzen da. Erreakzio akrosomikoaren ostean, espermatozoidearen gainazala berriro ere berrantolatzen da, barne mintz akrosomala agerian geratuz. Ondoren, obuluaren eta espermatozoidearen mintz plasmaticoaren elkartze eta fusioa gertatzen da segmentu ekuatorialean eta horrela fusioa gameto bakoitzaren alde espezifiko batera mugatzen da (de Lamirande et al, 1997). Gametoen fusioa gertatu eta gero, espermatozoidearen material genetikoa obuluarenean barneratzen da zigoto totipotente bat sortzeko.

## Sistema Opioidea

Aurretiaz esan bezala, espermatozoideek modu sekuentzian, mugitzeko kapazitatea, kapazitazioa eta hiperaktibazioa garatu behar dituzte, eta behin obozitoarekin kontaktuan daudenean, erreazio akrosomikoa jasaten dute horren barrura sartu ahal izateko eta zigotoa eratzeko. Komunikazio sistema askok erregulatzen dituzte prozesu hauek, sistema opioidea horietako bat da (Subiran et al 2012, Subiran et al 2011, Subiran et al, 2010, Subiran et al, 2008, Agirregoitia et al, 2006, Irazusta et al, 2004, Fernandez et al, 2002).

Sistema opioidea, fisiologian garrantzi handiko prozesu zelularrak erregulatzen dituen komunikazio zelularreko sistema bat da. Batez ere, minaren eta plazerraren erregulazioarekin erlazionatua izan da Nerbio Sistema Zentralean, eta pixkanaka-pixkanaka, ugalkortasuna eta garapena bezalako beste prozesu fisiologikoeekin zerikusia zuela frogatu da (Subiran et al, 2011). Hartzaille opioideak, G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub> proteinetara akoplaturiko hartzaille familiarkoak dira (GPCR) eta 7TM egitura daukate. Hau da, domeinu N- extrazelular bat daukate, 7 mintzarteko domeinu eta bukaerako buztan C-terminala. Hartzaille opioideek aurrera eramaten dituzten seinalizazio bideen artean adenilato ziklasaren inhibizioa, boltai menpeko kaltzio kanalen inaktibazioa, potasio kanalen aktibazioa, kaltzio erreserben mobilizazioa edota MAPK-en transdukzio bideen estimulazioa daude (Waldhoer et al, 2004).

Hartzaille horiek peptido opioide endogeno izeneko peptido bioaktibo bidez egiten dute lan. Farmakologikoki, hartzaille opioideen hiru mota deskribatu izan dira: delta opioide-hartzaillea (DOR), mu opioide-hartzaillea (MOR), morfinarekiko duen loturarengatik aurkitua, eta kappa opioide-hartzaillea (KOR).

### **Sistema opioidea eta ugalkortasuna**

Sistema opioidea, ugalketa funtzioa erregulatzeko gai da maila askotan eta azken ikerketek erakutsi dute fisiologia espermatikoan ere garrantzia duela (Subiran et al, 2011). Giza espermatozoideetan ikusi da sistema opioidearen osagaiak daudela (Liu et al, 1997; Fernandez et al, 2002; Irazusta et al, 2004; Agirregoitia et al, 2006; Subiran et al, 2008; Albrizio et al, 2010). Sistema horrek espermatozoideetan eragin zuzena du eta horregatik ugalketa funtzioaren erregulazioan betekizun garrantzitsua jokatutzen duela proposatzen da.

## **2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak**

Sistema opioidea ugalkortasunarekin erlazionatzen duten lehen ikerketa funtzionalek mugikortasun espermatikoa aztertu dute. Hartzaille opioideen agonista/antagonista bidez egindako ikerketa farmakologikoei erakutsi dute sistema opioideak mugikortasun espermatikoarekiko efektu bibalentea duela. Izan ere, opioideen kontzentrazio aldagarriak erabiliz, hartzaille desberdinen aktibazioa gertatzen da (Agirregoitia et al, 2006; Albrizio et al, 2005).

Hala ere, sistema opioideak erreazio akrosomikoan jokatzen duen funtzioa erabat ezezaguna da. Hori dela eta, gure lehen helburua sistema opioideak erreazio akrosomikoan duen eragina zehaztea izango da, prozesu hau ezinbestekoa baita espermatozoideak obulua eraldatzen. Horretarako beta-endorfina peptido opioidea erabiliko da. Hau gizonaren ugalketa aparatuan aurkitzen den barne peptido opioidea da eta dirudenez funtzio espermatikoa erregulatzen dihardu. Hala ere, giza espermatozoideen erreazio akrosomikoan daukan eragina gaur egun ezezaguna da. Hori dela eta, lan honen helburuak ondorengoak dira:

**1. Orokorrak:** Beta-endorfina peptido opioideak giza espermatozoidearen ahalmen ugalkorrean daukan funtzioa behatzea.

### **2. Espezifikoak:**

**2.1** Beta-endorfina peptido opioideak giza espermatozoidearen erreazio akrosomikoan duen funtzioa aztertzea eta zein hartzaille opioidearen bidez burutzen duen akzio hori zehaztea.

<sup>1</sup> (<http://www.who.int/reproductive-health/infertility/report.pdf>).

### 3.Ikerketaren muina

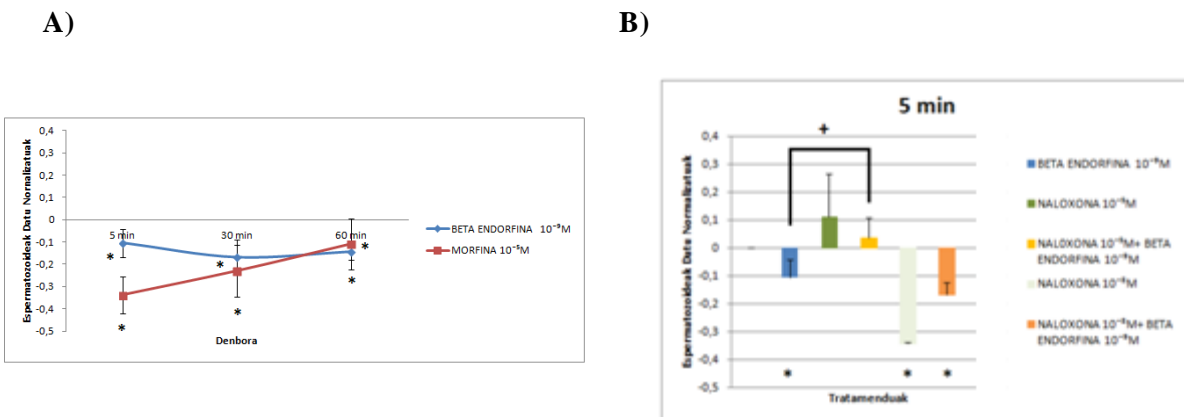
Ikerketarako IVI Bilbao Ugalketa-Klinikan eta Gurutzeta Unibertsitate Ospitaleko Giza-Ugalketa Unitatean lortutako giza-hazi normozoospermikoak erabili ziren, hau da, Osasun Mundu Erakundearen (2010) aholkuen arabera, parametro seminal guztiak betetzen zituzten haziak. Denetara, 200 lagin aztertu dira ikerketa hau aurrera eraman ahal izateko. Giza laginak erabiltzeagatik, ikerketa hau, Euskal Herriko Unibertsitateko Etika Komiteak onartu du (CEISH/61/2011). Espermatozoide mugikorren berreskurapenerako, *swim up* teknika erabili zen hazi freskoan. Teknika hau espermatozoide mugikorren berreskurapenean datza. Izan ere, aberastutako medio batean igeri egiteko gai diren espermatozoideak berreskuratuko dira. Ondoren, 3 orduz kapazitatu ziren %1 behi albumina zuen G-IVF® medioan 37°C-tan eta CO<sub>2</sub> %5ean. Ondoren, zenbait inkubazio egin ziren beta-endorfina 10<sup>-9</sup>M, naloxona 10<sup>-5</sup>M eta 10<sup>-8</sup>M eta morfina 10<sup>-5</sup>M kontzentrazioetan. Horrez gain, progesterona 10<sup>-5</sup>M kontzentrazioarekin inkubazioak egin ziren. Izan ere, progesterona erreakzio akrosomikoaren kontrol positibotzat erabiltzen da. Bestetik beta-endorfina eta naloxonaren (10<sup>-5</sup>M eta 10<sup>-8</sup>M) arteko koinkubazioak ere egin izan ziren. Populazio espermatozoideak inkubazioaren 5, 30 eta 60 minutuetan aztertu ziren.

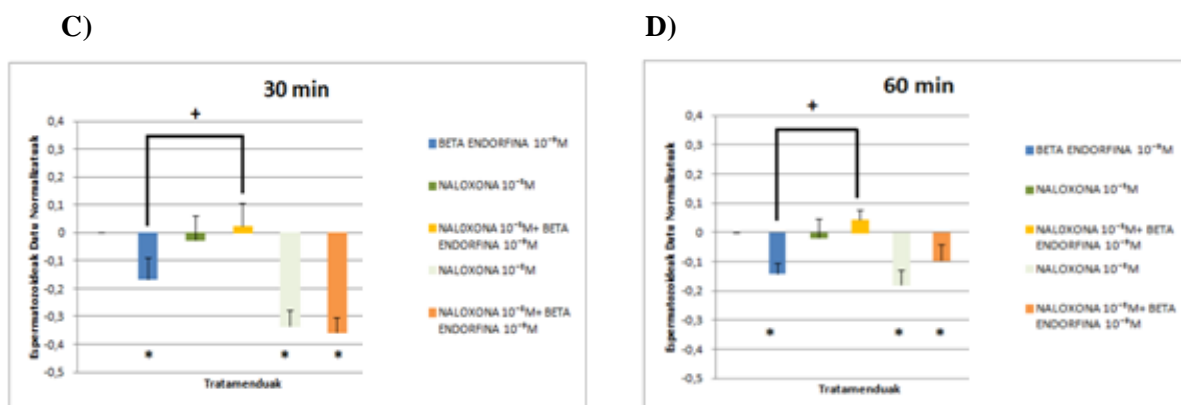
#### Fluxuzko zitometria

Sustantzia desberdinekin tratatutako laginetan zein lagin kontroletan, erreakzio akrosomikoaren neurketa fluxuzko zitometria bidez aztertu zen. Honen analisia egiteko anti-CD46-FITC (5µl/100µl) antigorputz konjugatua erabili zen. Erreakzio akrosomikoa pairatu duten espermatozoideetan barne-mintz akrosomalean CD46 proteina antigorputzarentzat eskuragarri dago. Horrez gain, bideragarritasun espermatozoidearen test bat egin zen, soilik bizirik zeuden zelulekin lan egiteko. Beraz, hilda zeuden zelulak baztertzeko Hoescht 33258 (0,1µg/ml) markatzailea erabili zen. Izan ere, hilda dauden zelulen nukleoan barneratzeke eta DNArekin batzeko gai da. Ondoren, lagin guztiak fluxuzko zitometria bidez aztertuak izan ziren. Zelula kapazitatu, ez kapazitatu eta erreakzio akrosomikoa jasan zuten populazioen aldaketak behatu ziren irudian ikusten den moduan .

Goian deskribatzen den metodologia jarraitu eta gero, eta SPSS programaren bidez analisi informatikoa egin eta gero, ondorengo emaitzak lortu ziren

**1.Irudia. Beta-endorfina eta opioide hartzaileen agonista eta antagonisten eragina giza espermatozoideen erreakzio akrosomikoan denboran zehar. A) Beta-endorfina 10<sup>-9</sup>M eta morfina 10<sup>-5</sup>M espermatozoideen erreakzio akrosomikoan duten eragina denboran zehar. Beta-endorfina eta opioide hartzaileen agonista eta antagonistek B) 5 minututan C) 30 minututan eta D) 60 minututan giza espermatozoideen erreakzio akrosomikoan duten eragina. (\* p<0,05, \*\* p<0,01 vs kontrola; +p<0,05, vs tratamendua. n=10)**





Beta-endorfinak erreakzio akrosomikoan zer nolako eragina ote duen aztertu zen. 1.irudiak erakusten duen bezala, beta-endorfinak erreakzio akrosomikoaren inhibizioa sortzen zuen, inhibizioaren magnitudea berdina zen aztertu ziren hiru denboretan ( $p < 0,05$ ). Morfinak, beta-endorfinaren agonistak, erreakzio akrosomikoan eragin berbera zuela ikusi zen. Izan ere, morfinak erreakzio akrosomikoa inhibitzen zuen ( $p < 0,05$ ). Hala ere, 1A grafikoa ikus daitekeenez, denbora pasa ahala morfinak eragiten duen inhibizioa gero eta txikiagoa zen. 5.minutuan inhibizioa handia izanik, 30.minutuan txikiagoa eta azkenik 60.minutuan ia nulua izanik ( $p < 0,05$ ).

Beta-endorfinak erreakzio akrosomikoan eragin inhibitzailea zuela ikusi zenean, ekintza hori hartzaile opioideen bidez burutzen ote zen aztertzerako ekin zitzaion. Horretarako koinkubazioak egin ziren hartzaile opioide antagonista den naloxonarekin, aurretik deskribatutako bi kontzentrazioetan.

Beta-endorfina naloxona  $10^{-5}M$ -arekin koinkubatuz gero, hiru denboratan beta-endorfinaren eragina sahiesten da (1B, 1D, 1E). Era berean, giza espermatozoideak naloxona  $10^{-5}M$ -eko kontzentrazioarekin inkubatzeak, ez dauka inolako efekturik erreakzio akrosomikoan. Hala ere, giza espermatozoideak naloxona  $10^{-8}M$  kontzentrazioarekin inkubatu zirenean aztertutako hiru denboratan erreakzio akrosomikoa inhibitzen zuen ( $p < 0,05$ ). Beta-endorfinarekin koinkubatuz gero, naloxona  $10^{-8}M$ -ak, inhibizioa handitzen zuen 30 minutuetan, estatistikoki adierazgarria izanik ( $p < 0,05$ ) (1D irudia). 5 eta 60 minutuetan, ordea, naloxona  $10^{-8}M$  eta beta-endorfinaren arteko koinkubazioa egiterako orduan erreakzio akrosomikoaren inhibizio partziala ikusi zen, baina ez totala ( $p < 0,05$ ) (1B eta 1E irudiak).

#### 4.Ondorioak

Beta-endorfinak erreakzio akrosomikoa inhibitzen du hartzaile opioideen bitartez. Ikerketek erakusten dute, beraz, sistema opioideak zerikusit nabaria izan dezakeela espermatozoidearen ahalmen ugalkorra garatzeko. Ondorioz, sistema opioidea ugalketaren erregulazioarako ezinbestekoa izan daiteke. Izan ere, antzutasun kasuetan, gizonezkoen antisorgailuen garapenean zein lagunduriko ugalketan tresna erabilgarria izan daiteke.

#### 5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Behin hartzaile opioideek beta-endorfinaren bidezko erreakzio akrosomikoaren inhibizioan betekizun argia daukatela ikusita, garrantzitsua litzateke inhibizio hori zein bide intrazelularren bidez eragiten duen aztertzea. Horrez gain, garrantzitsua litzateke beta-endorfinak kapazitazioan daukan eragina aztertzea. Giza espermatozoideen hartzaile opioideen azpitik dauden bide intrazelular espezifikoak ulertzea oso interesgarria izan daiteke antzutasunaren aurkako tratamendua bilatzerako orduan edota gizonezkoen antisorgailuen garapenean, besteak beste.

<sup>1</sup> (<http://www.who.int/reproductive-health/infertility/report.pdf>).

## 6. Erreferentziak

- Abou-haila A etaTulsiani DR (2009). Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 485:72–81.
- Agirreagoitia E, Valdivia A, Carracedo A. (2006). Expression and localization of  $\delta$ ,  $\kappa$  and  $\mu$  opioid receptors in human spermatozoa and implications for sperm motility. *J Clin Endocrinol Metab*;91:4969–4975.
- Albrizio M, Lacalandra GM, Micera E, Guaricci AC, Nicassio M, Zarrilli A. (2010). Delta opioid receptor on equine sperm cells: subcellular localization and involvement in sperm motility analyzed by computer assisted sperm analyzer (CASA). *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8:78.
- Austin CR.(1952). The 'capacitation' of the mammalian sperm. *Nature*, 170, 326.
- Breitbart H, Rubinstein S and Lax Y (1997). Regulatory mechanisms in acrosomal exocytosis. *Rev Reprod* 2 :65–174.
- Chang MC. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in the fallopian tubes. *Nature*, 168,697-698.
- Darszon A, Beltrán C, Félix R, Nishigaki T eta Treviño C (2001). Ion transport in sperm signaling. *Dev Biol* 340: 1–14.
- De Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C. (1997) .Capacitation as a regulatory event that primes a spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod.* 3(3):175-94.
- Fernandez D, Valdivia A, Ochoa C, Irazusta J, Casis L (2002).Peptidase activities in human semen. *Peptides* 23:461–468.
- Flesch F. M., Gadella B. M. (2000) Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta*,1469(3) 197-235.
- Fraser, L.R. eta Duncan, A.E. (1993). Adenosine analogues with specificity for A2 receptors bind to mouse spermatozoa and stimulate adenylate cyclase activity in uncapacitated suspensions. *J. Reprod. Fertil*, 98, 187-194.
- Herrick, S. B., Schweissinger, D. L., Kim, S. W., Bayan, K. R., Mann, S. and Cardullo, R. A. (2005). The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J. Cell. Physiol.* 202: 663-671.
- Irazusta J, Valdivia A, Fernandez D, Agirreagoitia E, Ochoa C,Casis L (2004). Enkephalin-degrading enzymes in normal and subfertile human semen. *J Androl* 25:733–739.
- Lishko PV, Botchkina IL, Kirichok Y.(2011). Progesterone activates the principal Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm.*Nature* 471: 387–391.
- Liu F, Tokeson J, Persengiev SP, Ebert K, Kilpatrick DL. (1997). Novel repeat elements direct rat proenkephalin transcription during spermatogenesis. *J Biol Chem.* 272(8):5056-62
- Patrat C, Serres C and Jouannet P (2000). The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol Cell* 92: 255-266.
- Publicover SJ and Barratt CLR. (1999). Voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels and the acrosome reaction: which channels are present and what do they do?*Hum Reprod.* 14873–879.
- Suarez SS. (2008). Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct.*Int J Dev Biol.* 54(5-6):455-62.
- Subiran N, Agirreagoitia E, Valdivia A, Ochoa C, Casis L, Irazusta J (2008). Expression of enkephalin-degrading enzymes in human semen and implications for sperm motility. *Fertil Steril* 89(5):1571–1577.
- Subiran N, Pinto FM, Agirreagoitia E, Candenas L, Irazusta J (2010). Control of APN/CD13 and NEP/CD10 on sperm motility. *Asian J Androl* 12:899–902.
- Subiran N, Casis L, Irazusta J. (2011).Regulation of male fertility by the opioid system. *Mol Med.*17(7-8):846-53.
- Subiran N, Candenas L, Pinto FM, Cejudo-Roman A, Agirreagoitia E, Irazusta J. (2012). Autocrine regulation of human sperm motility by the met-enkephalin opioid peptide. *Fertil Steril.* Sep;98(3):617- 625.
- Turner RM (2006). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev* 18:25–38.

- Visconti PE, Westbrook VA, Cherithin O, Demarco I, Sleight S eta Diekman AB (2002). Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* .53:133±150.
- Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JI. (2004). Opioid receptors. *Annu Rev Biochem*.73:953-90.
- Yanagimachi R. (1970). The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J Reprod Fertil*.23(1):193-6.
- Yanagimachi R eta Bhattacharyya A. (1988). Acrosome-reacted guinea pig spermatozoa become fusion competent in the presence of extracellular potassium ions. *J Exp Zool*. 248 (3): 354-60.
- Yanagimachi R (1994). Mammalian fertilization. *The Physiology of Reproduction*, 2. argitalpenean. Raven Press, New York argitaletxea .

## 7. Eskerrak eta oharrak

Itziar Urizarrek UPV/EHU-ko diru laguntza predoktorala jaso du, Iraia Muñoak Eusko Jaurlaritzako diru laguntza predoktorala jaso du, Haizea Estonbak Gangoiti Barrera Fundazioaren laguntza jaso du eta Marta Gianzok Eusko Jaurlaritzako Zabalduz diru laguntza predoktorala jaso du.

<sup>1</sup> (<http://www.who.int/reproductive-health/infertility/report.pdf>).