



**RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB  
LÀSER DE DÍODE DE 655 NM D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I  
POTÈNCIES D'IRRADIACIÓ  
Marc Ignasi Corral Baqués**

**ISBN:**  
**Dipòsit Legal: T.1240-2011**

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**TESI DOCTORAL**  
**Marc-Ignasi Corral-Baqués**



**RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA  
IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DÍODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A  
DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES D'IRRADIACIÓ**



UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DíODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES

Marc-Ignasi Corral-Baqués

ISBN/ DL:T.1240-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DíODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES

Marc-Ignasi Corral-Baqués

ISBN/ DL:T.1240-201

*Resposta de la motilitat espermàtica a la irradiació amb làser de díode de 655 nm d'emissió*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DÍODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES

Marc-Ignasi Corral-Baqués

ISBN/ DL:T.1240-201

*Resposta de la motilitat espermàtica a la irradiació amb làser de díode de 655 nm d'emissió*

Marc-Ignasi Corral-Baqués

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA  
IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DÍODE DE 655 NM  
D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES  
D'IRRADIACIÓ

TESI DOCTORAL

dirigida per la Dra. Josefa Rigau Mas,  
la Dra. Teresa Rigau i Mas  
i la Dra. Maria Rosa Fenoll Brunet

Departament  
de Ciències Mèdiques Bàsiques



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Reus  
2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DíODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES

Marc-Ignasi Corral-Baqués

ISBN/ DL:T.1240-2011

UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI  
FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT  
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES

Carrer Sant Llorenç, 21  
43201 Reus  
Tel. 977 759 306  
Fax 977 759 352

FEM CONSTAR que aquest treball, titulat "Resposta de la motilitat espermàtica a la irradiació amb làser de díode de 655 nm d'emissió a diferents energies i potències d'irradiació", que presenta Marc-Ignasi Corral-Baqués per a l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la nostra co-direcció al Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques d'aquesta Universitat i al Departament de Medicina i Cirurgia Animals de la Universitat Autònoma de Barcelona i aconpleix els requeriments per poder optar aquest títol acadèmic.

Reus, 11 de març de 2011

Dra. Josepa Rigau Mas

Dra. Teresa Rigau Mas

Dra. M.Rosa Fenoll Brunet



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DíODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES

Marc-Ignasi Corral-Baqués

ISBN/ DL:T.1240-2011

*A tots els qui m'han estimat i m'estimen de veritat*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DíODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES

Marc-Ignasi Corral-Baqués

ISBN/ DL:T.1240-201

*Resposta de la motilitat espermàtica a la irradiació amb làser de díode de 655 nm d'emissió*

## AGRAÏMENTS

Aquesta tesi no hauria vist mai la llum, si no hagués estat per la col·laboració incondicional d'un munt de belles i grans persones que no sols m'han sabut donar la seva guia científica sinó també el seu escalf humà. Per por de ser un mal examinador no graduaré llur grau d'excel·lència i les citaré per ordre alfabètic:

Álex Peña: per les mans del plaer.

Isabel Obrados: per la seva encantadora rigorositat flexible.

Joan Enric Rodríguez Gil: per no ser un heroi de còmic, sinó de carn i ossos.

Josepa Rigau i Mas: pel seu gran despreniment i *laissez faire*.

Maria Montserrat Rivera del Álamo: per la incondicional E S T I M A D A treballadora.

Maria Rosa Fenoll i Brunet: perquè els flagels divins també són terrenals.

Teresa Rigau i Mas: perquè junts hem fet ciència!

No cal dir que no es pot fer ciència del làser sense làser, i aquí l'empresa SOR Internacional, S. A. (SORISA) i, en concret, en Manuel Sánchez Soriano, són qui han possibilitat que aquesta recerca es pogués dur a terme.

Per a tots els esmentats i també per a aquelles persones que, al marge del doctorat i la recerca científica, han estat al meu cantó en tot moment, el meu més profund agraïment, reconeixement i estimació.

2010 en el dia de sant Veneri

Cel·la 5, Sant Josep

Monestir de Montserrat

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DíODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES

Marc-Ignasi Corral-Baqués

ISBN/ DL:T.1240-201

*Resposta de la motilitat espermàtica a la irradiació amb làser de díode de 655 nm d'emissió*

“Hoy, además de estos curanderos «a la antigua», están proliferando con gran éxito otros que utilizan técnicas como la acupuntura, el láser, la hipnosis, la sugestión, la sofrología, la cirugía incruenta y los poderes psicotrónicos.”

Pilar Salarrullana

*Las sectas satánicas. La cara oculta de los esclavos de Lucifer*

Ediciones Temas de Hoy, 1991

“Il n’y a rien de pire que ceux qui veulent faire le bien, en particulier le bien pour les autres. Il en est de même de ceux qui «pensent bien». Ils ont l’irrésistible tendance à penser pour et à la place des autres.”

Michel Maffesoli

*La part du diable. Précis de subversion postmoderne*

Flammarion, 2002

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DíODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES

Marc-Ignasi Corral-Baqués

ISBN/ DL:T.1240-2011

## RESUM

Aquesta recerca aporta evidències sobre l'ús potencial de la llum làser de díode de 655 nm d'emissió contínua per modificar la motilitat espermàtica canina. El model experimental emprat ha estat el de mostres fresques de semen de gossos adults ( $5.9 \pm 2.1$  anys) i sans de raça beagel, que han estat sotmeses a diferents dosis i potències d'irradiació làser. S'han analitzat els diferents paràmetres de motilitat i les subpoblacions espermàtiques. Els resultats indiquen clarament que l'energia làser modula la motilitat espermàtica i que aquest efecte és dosi dependent i potència dependent, mitjançant un mecanisme d'acció no relacionat amb els mecanismes de la tirosina ni per les espècies reactives d'oxigen mitocondrial (mROS).

**Paraules clau:** làser, esperma, gos, motilitat, subpoblacions.



## ABSTRACT

This research provides evidences on the potencial use of the 655 nm continuous wave diode laser irradiation to modify the canine sperm motility. The experimental model used has been fresh samples from adult ( $5.9 \pm 2.1$  years old) and healthy beagle dog sperm that have been exposed to different doses an output powers of laser irradiation. The different motility parameters have been analysed as well as the spermatic subpopulations. The results clearly indicate that the laser energy modulates the sperm motility and that this effect is depends on the dose and on the output power. This effect is done by a mechanism of action that is not related to tirosine mechanism nor to mitochondrial reactive oxygen species (mROS).

**Key words:** laser, sperm, dog, motility, subpopulations.

**ABREUJAMENTS****Å** = Àngstrom:  $10^{-10}$  m**AI** = Índex d'angularitat**ALHmed** = Amplitud mitjana de desplaçament lateral**ATP** = Trifosfat d'adenosina**BCF** = Freqüència de batuda del cap**C** = Centígrad**c** = Velocitat de la llum:  $299.792.458 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ **CASA** = Anàlisi espermàtica assistida informàticament (*Computer-aided Sperm Analysis*)**cm** = Centímetre**CO<sub>2</sub>** = Diòxid de carboni**DNC** = *Dance***DO** = Dosi 0  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ **D2** = Dosi 2  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ **D4** = Dosi 4  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ **D6** = Dosi 6  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ **D12** = Dosi 12  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ **D16** = Dosi 16  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ **DE** = Densitat d'energia (fluència)**DP** = Densitat de potència (irradiància)**E** = Energia**E<sub>T</sub>** = Energia total**eV** = Electronvolt**g** = Gram**g** = Gravat**GHz** = Gigahertz**GLM** = Model lineal generalitzat**h** = Constant de Plank**H** = Hidrogen**HeNe** = Heli-neó**HLO** = Menor oscil·lació harmònica del cap

<b>H<sub>2</sub>O</b>	=	Aigua
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	=	Peròxid d'hidrogen
<b>HOST</b>	=	Test d'endosmosi ( <i>Hypoosmotic Swelling test</i> )
<b>H<sub>Y</sub></b>	=	Amplitud de l'harmònic
<b>Hz</b>	=	Hertz
<b>IEC</b>	=	Institut d'Estudis Catalans
<b>J</b>	=	Joule
<b>K</b>	=	Potassi
<b>λ</b>	=	Longitud d'ona
<b>LIN</b>	=	Índex de linealitat
<b>LLL</b>	=	Làser de baixa potència ( <i>Low Level Laser</i> )
<b>LLL<sub>T</sub></b>	=	Teràpia làser de baixa potència ( <i>Low Level Laser Therapy</i> )
<b>LPT</b>	=	Fototeràpia làser ( <i>Laser Phototherapy</i> )
<b>LSMEANS</b>	=	<i>Least Squares Means</i>
<b>m</b>	=	Metre
<b>ml</b>	=	Mil·lilitre
<b>mROS</b>	=	Espècies reactives de l'oxigen d'origen mitocondrial
<b>μm</b>	=	Micròmetre
<b>mOsm</b>	=	Mil·liosmol
<b>MT</b>	=	Motilitat total
<b>mW</b>	=	Mil·liwatt
<b>Na</b>	=	Sodi
<b>NaCl</b>	=	Clorur sòdic
<b>NAD<sup>+</sup></b>	=	Forma oxidada de la nicotinamida-adenina-dinucleòtid
<b>NADH</b>	=	Nicotinamida-adenina-dinucleòtid
<b>nm</b>	=	Nanòmetre
<b>NOs</b>	=	Òxids de nitrogen
<b>Nd:YAG</b>	=	Làser de granat d'alumini i itri dopat amb neodimi
<b>v</b>	=	Freqüència
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	=	Oxigen singlet
<b>ORT</b>	=	Test de resistència osmòtica
<b>P</b>	=	Potència
<b>P0</b>	=	Potència 0 mW
<b>P7</b>	=	Potència 6.8 mW

- P15** = Potència 15.4 mW
- P33** = Potència 33.1 mW
- P50** = Potència 49.7 mW
- PBS** = *Phosphate Buffered Saline*
- PDT** = Teràpia fotodinàmica (*Photodynamic Therapy*)
- Pi** = Ió fosfat
- P<sub>m</sub>** = Potència mitjana
- REM** = Radiacions electromagnètiques
- RNA** = Àcid ribonucleic
- R-OOH** = Peròxids
- ROS** = Espècies reactives de l'oxigen (*Reactive Oxygen Species*)
- S** = Superfície
- s** = Segon
- SAS<sup>®</sup>** = *Statistical Analysis System*
- SD** = Desviació estàndard
- SE** = Sèrie experimental
- SE1** = Sèrie experimental 1
- SE2** = Sèrie experimental 2
- SE3** = Sèrie experimental 3
- SE4** = Sèrie experimental 4
- SE5** = Sèrie experimental 5
- Sbp** = Subpoblació
- SEM** = Error estàndard
- STR** = Índex de rectitud
- T** = Temps
- VAP** = Velocitat lineal
- VCL** = Velocitat curvilínia
- UI/L** = Unitat internacional per litre
- VSL** = Velocitat rectilínia
- $\chi^2$**  = Khi quadrat
- W** = Watt
- WOB** = Índex d'oscil·lació (Wobble)
- (w/v)** = Pes / volum
- YAG** = Granat d'itri i alumini

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DÍODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES

Marc-Ignasi Corral-Baqués

ISBN/ DL:T.1240-201

*Resposta de la motilitat espermàtica a la irradiació amb làser de díode de 655 nm d'emissió*

## **APORTACIONS CIENTÍFIQUES**

Del treball realitzat durant l'elaboració d'aquesta tesi s'han presentat tres comunicacions a congressos internacionals i s'han publicat tres articles.

### **Presentacions en congressos**

2008- WALT (7th International congress of the World Association for Laser Therapy)  
19-22 October, Sun City, South Africa.

“The effect of Low Level Laser Irradiation on dog sperm motility is dependent on Power laser application”. – Corral-Baqués MI, Rivera MM, Rigau T, Rodríguez-Gil JE, Rigau J.

2006- SPIE (The International Society for Optical Engineering, Biophotonics and New Therapy Frontiers), 3rd of April 2006, Strasbourg, France.

“Effect of 655-nm laser at different powers on dog sperm motility parameter” – Corral-Baqués MI, Rigau T, Rivera MM, Rodríguez-Gil JE, Rigau J.

2004- Light Activated Tissue Regeneration and Therapy I. Engineering Conferences International. August 22 – 27th, 2004. Kona, Hawaii – EUA.

“Effect Of 655 nm Diode Laser on Dog Sperm Motility” - Corral-Baqués MI; Rigau J.

### **Articles científics**

Corral-Baqués MI, Rivera MM, Rigau T, Rodríguez-Gil JE, Rigau J. The Effect of Low Level Laser Irradiation on Dog Sperm Motility Is Dependent on Laser Output Power. Lasers in Medical Science. 2009; 24 (5): 703-713.

Corral-Baqués MI, Rigau T, Rivera M, Rodríguez-Gil JE, Rigau J. Effect of 655 nm diode laser on dog sperm motility. Lasers in Medical Science. 2005; 20 (1): 28-34.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DíODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES

Marc-Ignasi Corral-Baqués

ISBN/ DL:T.1240-201

*Resposta de la motilitat espermàtica a la irradiació amb làser de díode de 655 nm d'emissió*

**ÍNDEX**

<b>AGRAÏMENTS</b> .....	xi
<b>RESUM</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>ABREUJAMENTS</b> .....	xvii
<b>APORTACIONS CIENTÍFIQUES</b> .....	xxi
<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	3
<b>1.1. LA LLUM (RADIACIONS ELECTROMAGNÈTIQUES)</b> .....	3
<b>1.2. LA RADIACIÓ LÀSER</b> .....	7
1.2.1. Aplicacions biològiques del làser .....	8
1.2.2. L'energia d'un làser.....	11
<b>1.3. L'ESPERMATOZOIDE</b> .....	14
1.3.1. Anàlisi qualitativa del semen .....	16
1.3.2. Anàlisi de la motilitat.....	18
1.3.2.1. Subpoblacions espermàtiques.....	23
1.3.3. Proves funcionals .....	24
1.3.3.1. Producció de L-lactat.....	24
1.3.3.2. Resistència osmòtica .....	25
1.3.3.3. Fosforilació / desfosforilació de la tirosina .....	26
1.3.4. Les espècies reactives de l'oxigen (ROS).....	26
<b>1.4. IRRADIACIÓ LÀSER</b> .....	27
1.4.1. Precedents de la irradiació d'espermatozoides amb làser.....	27
<b>2. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS</b> .....	31
2.1. Objectiu general.....	31
2.2. Objectius específics .....	31
<b>3. MATERIAL I MÈTODES</b> .....	35
3.1. Model d'estudi .....	35
3.2. Sèries experimentals .....	35
3.3. Obtenció de les mostres .....	36
3.3.1. Preparació de les mostres .....	37
3.4. Font làser .....	37
3.5. Irradiació de les mostres.....	38
3.6. Avaluació computeritzada de la motilitat (CASA) .....	40
3.7. Determinació de la viabilitat dels espermatozoides.....	40
3.8. Test de resistència osmòtica .....	41
3.9. Determinació del ritme de formació de L-lactat .....	42
3.10. Anàlisi estadística .....	43
3.11. Detecció de proteïnes.....	45
3.12. Observació de la formació d'espècies reactives de l'oxigen associades als mitocondris .....	46
3.13. Prevenció de riscos .....	48
<b>4. RESULTATS</b> .....	53
<b>4.1. Sèrie experimental 1 (Dosi d'estimulació espermàtica)</b> .....	53
4.1.1. Efectes de les diferents dosis en la viabilitat de l'esperma de gos .....	53
4.1.2. Efectes de les diferents dosis en les característiques de motilitat de l'esperma de gos.....	53
4.1.3. Proves metabòliques .....	55
<b>4.2. Sèrie experimental 2 (Rang d'afectació espermàtica per làser)</b> .....	56
4.2.1. Efectes de les diferents dosis en la viabilitat de l'esperma de gos .....	57
4.2.2. Efectes de les diferents dosis en les característiques de motilitat de l'esperma de gos.....	57



4.2.3. Efectes de les diferents dosis en les subpoblacions de l'esperma de gos .....	59
4.2.4. Proves metabòliques .....	66
4.3. Sèrie experimental 3 (Determinació de la tirosina fosforilada).....	66
4.4. Sèrie experimental 4 (Determinació de la influència de la potència d'emissió).....	66
4.4.1. Efecte de les diferents potències en la viabilitat de l'esperma de gos .....	67
4.4.2. Efecte de les diferents potències en les característiques de motilitat de l'esperma de gos.....	67
4.4.3. Efecte de les diferents potències en les subpoblacions de l'esperma caní.....	70
4.4.4. Proves metabòliques .....	76
4.5. Sèrie experimental 5 (Determinació d'espècies reactives d'oxigen).....	76
5. DISCUSSIÓ .....	81
5.1. Plantejament i estructuració de la recerca .....	81
5.2. Anàlisi dels resultats per sèries experimentals .....	83
5.3. Anàlisi de l'estudi subpoblacional.....	87
5.4. Anàlisi conjunta dels resultats.....	89
5.5. Futura recerca.....	93
6. CONCLUSIONS .....	97
7. BIBLIOGRAFIA.....	101
8. GLOSSARI.....	125
ANNEX: ARTICLES PUBLICATS .....	¡Error! Marcador no definido.



# INTRODUCCIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DíODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES

Marc-Ignasi Corral-Baqués

ISBN/ DL:T.1240-201

*Resposta de la motilitat espermàtica a la irradiació amb làser de díode de 655 nm d'emissió*

## 1. INTRODUCCIÓ

La *fotònica*\* és la ciència que estudia les propietats de la llum per utilitzar-la com a eina. Actualment, un major coneixement de la llum ha permès desenvolupar formes molt acotades d'emissió lumínica, com els làsers\*, que han permès utilitzar les propietats de la llum d'una manera més específica i eficient damunt els teixits biològics, i els ha convertit així en instruments fonamentals per a la biologia i les ciències de la salut.

En els darrers anys, el desenvolupament de la tecnologia ha disparat un interès creixent per conèixer els fonaments biològics dels efectes de la llum làser sobre els teixits vius, tant en condicions fisiològiques com en situacions patològiques. Tant en l'àmbit de la medicina com en el de la veterinària, representa un nou camp per a la recerca multidisciplinària i l'aplicació de noves tecnologies en l'àmbit de la biomedicina. En aquest context, cal la col·laboració entre empreses i universitat per a la innovació de noves tecnologies, així com una posada en comú de diverses àrees de coneixement: la física quàntica, la biologia i les ciències de la salut. Aquest treball de recerca científica pretén aportar nous coneixements en l'àmbit de la reproducció assistida de mamífers i, alhora, descobrir noves aplicacions de la llum làser en el camp de la reproducció animal a través de la seva acció sobre la motilitat espermàtica, atesa l'existència d'un gran interès per poder resoldre problemes d'infertilitat, cada cop més freqüents, i per a la millora en la productivitat ramadera o protecció d'espècies, per citar alguns dels camps més rellevants.

Donat, doncs, l'imprescindible enfocament interdisciplinari d'aquesta recerca, cal introduir, necessàriament de forma breu, els conceptes més fonamentals de física quàntica, fotònica i biologia que ens permetran discutir els resultats i les aportacions científiques.

### 1.1. LA LLUM (RADIACIONS ELECTROMAGNÈTIQUES)

En parlar de llum hom es refereix a una porció de l'espectre\* visible de les radiacions\* electromagnètiques (REM) i, per extensió, a les REM en general. La radiació no és formada per un contínuum d'energia, ans al contrari, és constituïda o és divisible en paquets d'energia o quàntums\*, que anomenem *fotons*\*. Es considera

---

\* Tots els termes (en aparèixer per primer cop) acompanyats d'asterisc són definits al glossari.

que el fotó no té massa, tot i que el premi Nobel de física Feynman a les seves *Lectures on physics* digué: “Even light, which has an energy, has a mass” (Fins i tot la llum, que té una energia, té una massa) (Feynman, 1977). En estudiar les diferents formes d'interacció de la llum amb altres radiacions o amb la matèria, es constata que els fotons tenen un comportament dual, a voltes els seus efectes es poden explicar com si els fotons fossin formats per partícules o corpuscles i d'altres com si es propaguessin en forma d'ones. El fenomen de la reflexió\* s'explicaria tenint en compte la concepció del fotó com a partícula, que modifica la seva trajectòria en impactar sobre una superfície com si es tractés d'una pilota; per contra, el fenomen de la interferència\* s'explicaria si la naturalesa del fotó fos ondulatoria. D'aquí la concepció del fotó com a dualitat ona-corpúscle (Bröcker, 1988).

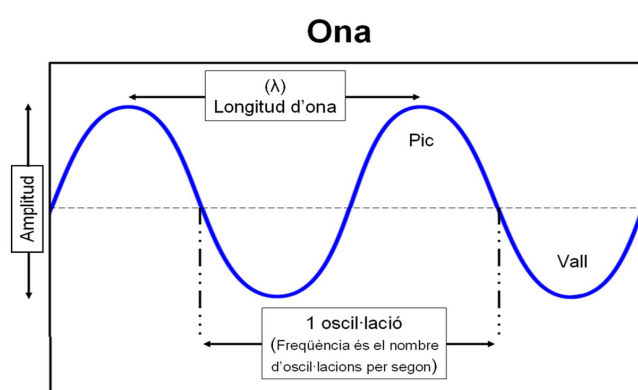


Figura 1. Elements que integren un ona.

Les ones es poden classificar per la seva llargària, és a dir, pel que s'anomena *longitud d'ona* (figura 1), que es determina per la distància entre dos pics consecutius, o per la seva freqüència\* o nombre d'oscil·lacions. En les REM la freqüència i la longitud d'ona estan interrelacionades segons la fórmula:

$$v = c/\lambda$$

On:

$v$  és la freqüència expressada en hertz (Hz)

$c$  és la velocitat de la llum (299.792.458 metres·segon<sup>-1</sup> (m·s<sup>-1</sup>))

$\lambda$  és la longitud d'ona en metres (m).

Igualment la longitud d'ona d'un fotó o la seva freqüència determina la seva energia segons la fórmula:

$$E = h \cdot v$$

On:

$E$  és l'energia expressada en electronvolts (eV;  $1 \text{ eV} = 1.60 \times 10^{-19}$  Joules (J))

$h$  és la constant de Plank ( $6.6252 \cdot 10^{-27}$  ergs-segon (erg·s))

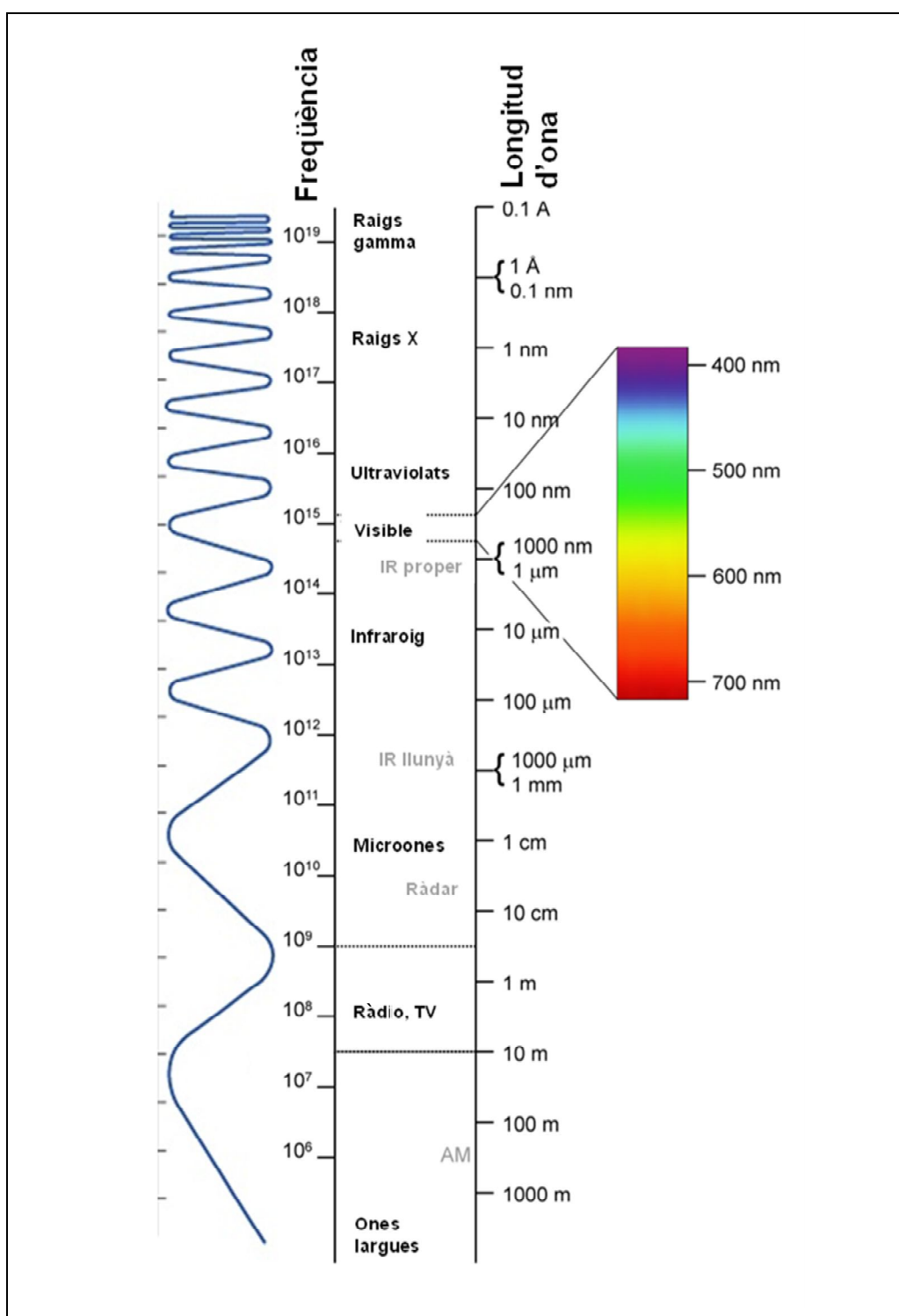
$\nu$  és la freqüència en hertz (Hz).

Un fotó, des del punt de vista físic, en trobar-se un cos en la seva trajectòria pot interactuar-hi de diferents maneres i experimentar qualsevol dels fenòmens següents: reflexió, refracció\*, dispersió\*, transmissió\* i/o absorció\*.

La capacitat d'un cromòfor\* d'absorbir un fotó, i fer que aquest desaparegui, es determina per la longitud d'ona del fotó i de les característiques físiques del cromòfor que fan que ressonin\*.

Les REM es divideixen segons les longituds d'ona en: raigs gamma, raigs X, ultraviolats\*, llum visible, infraroigs\*, etc. (figura 2). Quan la longitud d'ona d'un fotó és compresa entre els 400 i els 759 nm, aproximadament, aquest és capaç de ressonar amb un cromòfor de la nostra retina i el definim com a *llum*, aquests fotons pertanyen al rang o espectre del visible de les REM o també anomenat *llum visible*.

Els fotons de longitud d'ona més curta ja no ressonen amb els cromòfors de la retina i, per tant, no poden ser vistos; aquests darrers fotons, però, tenen major energia. Com més curta és la longitud d'ona, més energètic és el fotó, i pot trencar enllaços químics i alterar el material genètic, i es converteix així en una radiació mutagènica; d'aquí que els raigs ultraviolats (UV) i, especialment, els que pertanyen a l'UVC\*, poden desenvolupar o facilitar l'aparició de fenòmens tumorals i càncer (Brozyna i Chwirot, 2005; Pfeifer i col·l., 2005; Agar i col·l., 2004; de Gruijl, 2002). El nostre organisme posseeix, principalment a la pell, un cromòfor anomenat *melanina*\* que ressona amb fotons amb longituds d'ona, entre 200 i 400 nm, i es bloqueja, d'aquesta manera, l'acció nociva dels raigs UV que en presència d'oxigen produeix l'oxidació de la melanina\* i l'enfosqueix, procés que dóna lloc al bronzejat de la pell humana (Miyamura i col·l., 2011). Per contra, com més llarga és la longitud d'ona, menor és l'energia del fotó. Més enllà de l'espectre visible s'hi troba el que anomenem *radiacions infraroges*, que tampoc són capaces de ressonar amb la retina de l'ull i que són emeses per qualsevol cos calent. Aquestes radiacions, igual que el visible no són capaces de trencar enllaços bioquímics ni poden alterar el genoma i, per tant, no són cancerígenes.



**Figura 2.** Representació gràfica de l'espectre de les radiacions electromagnètiques (REM). A la primera columna es mostra, de forma orientativa però no proporcional, com canvia la longitud d'ona amb la relació corresponent a l'evolució de les freqüències de les ones. La segona columna mostra el rang de freqüències corresponents. La columna de la dreta presenta l'equivalència de la freqüència amb la longitud d'ona, la zona ampliada correspon a la porció visible de l'espectre electromagnètic.

Retornant a l'espectre visible, a cada longitud d'ona li correspon un sol color, de manera que un fotó de 632.8 nm de longitud d'ona el percebem de color vermell. Però la longitud d'ona no sols determina l'energia d'un fotó o el seu color, sinó també altres propietats com ara l'índex de refracció. Si fem passar un feix de llum blanca per un prisma, en canviar de medi pel qual viatja, els fotons que l'integren veuran desviada la seva trajectòria en funció de llur longitud d'ona, de manera que a cadascuna d'aquestes li correspondrà un angle de desviació o refracció diferent; d'aquesta manera se separen els colors d'un feix de llum blanca, la qual cosa dóna lloc a l'arc de Sant Martí; per tant, la llum que percebem com a blanca, en veritat no és formada per un sol tipus de fotons, sinó per la suma de fotons amb les diferents longituds d'ona que comprèn l'espectre del visible (Bröcker, 1988).

## 1.2. LA RADIACIÓ LÀSER

El terme *làser* inclou dos conceptes diferents: aparell capaç de generar un feix de llum d'una sola longitud d'ona i el raig làser en si, generat per aquest aparell. No s'analitzarà com es genera un feix làser, perquè no és el propòsit d'aquesta tesi ni ajuda a la comprensió dels seus efectes sobre la matèria.

El làser és una forma de llum desenvolupada per l'ésser humà, que no existeix de forma natural en l'univers i que sols es pot generar artificialment. Es tracta d'un feix de llum constituït per fotons clònics; és a dir, fotons que tenen la mateixa longitud d'ona, bessons idèntics, de manera que tots tenen les mateixes propietats físiques. Aquests fotons es propaguen en un mateix pla i creen un feix coherent\* que se sol col·limar\*, característica que fa que no es dispersin els fotons al llarg de la seva trajectòria i que el feix sigui direccional\*, aquests trets propis del làser permeten concentrar una gran quantitat d'energia en un punt d'incidència anomenat *spot*\*. Cal dir que físicament no és possible fer un làser perfecte. A la pràctica, un làser a part dels fotons amb la mateixa longitud d'ona també emet, en una proporció insignificant, fotons amb longituds d'ona lleugerament superiors i inferiors de l'emissió principal.

S'ha de dir que hi ha diferents maneres de generar un feix làser, i el nom que reben els diferents làsers (robí, alexandrita, diòxid de carboni —CO<sub>2</sub>—, heli-neó, etc.) no correspon a noms comercials, sinó al material excitable que genera un raig làser. A cada material capaç de *lasejar*\* li correspon una longitud d'ona en concret, de



manera que en parlar d'un làser d'heli-neó (HeNe) sabem que l'emissió és de 632,8 nm, el de CO<sub>2</sub> de 10600 nm, o en parlar d'un làser de granat d'alumini i itri dopat amb neodimi (Nd:YAG) l'emissió és de 1064 nm (Trelles i col·l., 2008). Dins les diferents formes de generar un raig làser hi ha un subgrup que ha representat un impuls tecnològic molt important, els anomenats *làsers de díode\**, on la manera d'excitar el material és lleugerament diferent, però que igualment que els anteriors, en funció del material amb què està compost un díode determina la longitud d'ona de la seva emissió. El rang de longituds d'ona que emet un làser de díode, tot i ser molt estret, no és tan pur com el dels altres tipus de làser, de manera que el percentatge de fotons que no tenen la longitud d'ona principal és major en proporció i en variabilitat, tot i ser també pràcticament insignificant a efectes pràctics.

És, doncs, el làser una forma artificial d'emissió de fotons idèntics que permet estudiar la interacció d'una sola longitud d'ona damunt les cèl·lules, teixits biològics i òrgans.

### 1.2.1. Aplicacions biològiques del làser

Des dels orígens del desenvolupament militar del làser, a principi de la dècada dels seixanta, ja se li van cercar usos mèdics (Solon i col·l., 1961; Laser, 1962; Goldman i col·l., 1963; Saks i Roth, 1963; Malt, 1965; Laor i col·l., 1965; Mester, 1966; Tunér i Hode, 2002*b*). Actualment, el làser s'aplica en un gran nombre d'especialitats mèdiques i quirúrgiques amb diferents propòsits, com ara: ablatius\*, biomoduladors\* o inhibidors, per destacar-ne alguns. Els seus efectes es divideixen en quatre tipus d'acció (Trelles i col·l., 2008) (taula 1).

#### **Fotoacústic\***

#### **Fotoablatiu\***

#### **Tèrmic**

— Vaporització

— Coagulació

#### **No tèrmic**

— Fotoquímic

. Fotocitotòxic\*

. Fotobiomodulador\*

**Taula 1.** Efectes biològics dels làsers.

Que el làser tingui diferents efectes i propietats en la interacció amb els teixits biològics es determina per un gran nombre de variables que depenen tant de les característiques del làser com de l'estructura o teixits vius a irradiar (taula 2).

#### **Factors dependents del teixit viu**

- Estat base del teixit: teixit sa *versus* patològic.
- Profunditat del teixit diana a irradiar.
- Presència d'elements patògens (infecció, edema).
- Concentració de cromòfors.
- Presència de competidors (altres cromòfors sobre els quals no es vol actuar).
- Presència o no de fotosensibilitzadors\*.
- Biodisponibilitat d'oxigen.
- Concentració de metabòlits intermediaris o cofactors.

#### **Factors dependents del làser:**

- Longitud d'ona
- Potència
- Emissió contínua o polsada.
- *Spot*: determina la densitat d'energia\* (fluència\*) i la densitat de potència (irradiància) que es diposita en un teixit.
- Fluència.
- Irradiància.

**Taula 2.** Principals factors que determinen les propietats i efectes del làser damunt dels teixits vius.

### **Biomodulació mitjançant la fototeràpia làser (LPT)**

Ja des de l'inici de l'ús del làser, els seus efectes sobre els teixits biològics han estat motiu d'estudi i s'ha demostrat que hi ha una resposta biològica a la irradiació làser de baixa potència o LLL (de l'anglès *Low Level Laser*), anomenada *fototeràpia làser* o LPT (de l'anglès *Laser Phototherapy*), terme que substitueix el que fins ara s'ha anomenat *teràpia làser de baix nivell* o LLLT (de l'anglès *Low Level Laser Therapy*). La biomodulació\* fa referència a la capacitat d'incidir, ja sigui estimulants o inhibits, en els processos metabòlics cel·lulars (Vélez i col·l., 2008a). Així doncs, la biomodulació actua principalment en les reaccions bioquímiques i físiques que es donen a la cèl·lula.

En l'aplicació de l'LPT clàssicament es considera que perquè la llum tingui un efecte biològic, l'energia fotònica ha de ser absorbida per un cromòfor. Karu (1998) va suggerir que els citocroms de la membrana interna mitocondrial absorben fotons de diferents longituds d'ona, aquesta absorció duria a l'augment de síntesi de l'ATP; tot i que s'han descrit situacions que demostrarien que no sempre és necessària aquesta absorció. Segons Amat i col·l. (2005), l'absorció no és un requisit *sine qua non* perquè un feix de REM pugui exercir una influència sobre certs àtoms o molècules. Born i Wolf (1985) ja van descriure que freqüències no ressonants\* de la llum provoquen desplaçaments de càrregues elèctriques dins una mateixa molècula i donen lloc a fenòmens de polarització\*. Biològicament, aquest fenomen pot implicar canvis en l'activitat de la molècula polaritzada, sobretot en aquelles estructures que formen enllaços conjugats (Amat, 2005).

L'ús de làsers és una forma òptima de proporcionar d'energia les cèl·lules; aquestes utilitzen l'energia per realitzar aquelles funcions en les quals es troben implicades; és a dir, si estan sintetitzant col·lagen la utilitzen per a aquesta síntesi (Rigau, 1996); si estan en mitosi, per completar la divisió cel·lular (Almeida-Lopes i col·l., 2001). En estudiar com les cèl·lules usen l'energia de l'LPT, s'ha vist que els efectes més notoris es donen en les cèl·lules o teixits que es troben sota alguna forma d'estrès (Tunér i Hode, 2002b): dèficit d'ATP (Lubart i col·l., 1997), hipoglucèmia, etc. (Yamamoto i col·l., 1996).

Hi ha un gran nombre d'estudis dels efectes de l'LPT sobre diferents tipus cel·lulars, la majoria dels quals són fets amb fibroblasts (Almeida-Lopes i col·l., 2001; Hawkins i Abrahamse, 2006); però aquests no són les úniques cèl·lules que responen a l'LPT, els osteoblasts responen a l'LPT activant o accelerant la reparació òssia (Rochkind i col·l., 2004; Blaya i col·l., 2008; Stein i col·l., 2008), en les fibres musculars actua sobre la seva regeneració (Bulyakova i Azarova, 2006) i el mateix s'esdevé en la regeneració nerviosa (Milorio i col·l., 2002; Rochkind i col·l., 2002; Mathew i col·l., 2010). També s'ha objectivat la seva acció en la curació d'úlceres (Demidova-Rice i col·l., 2007; Corazza i col·l., 2007) i la seva acció en la unió neuromuscular (Nicolau i col·l., 2004). No es veuen exclosos d'aquesta acció biomodulant de l'LPT els espermatozoides (Marín i Vélez, 1990; Iaffaldano, 2005; Zan-Bar i col·l., 2005; Lubart i col·l., 2003), però aquest punt es desenvolupa en l'apartat 1.4.1.

### 1.2.2. L'energia d'un làser

Les variables importants a considerar en una emissió làser, a part de la longitud d'ona, és l'energia que emet, la potència, així com la densitat d'energia\* o fluència\*, i la densitat de potència\* o irradiància\*:

$$E = P \times T$$

On:

$E$  és l'energia expressada en joules (J)

$P$  és la potència expressada en watts (W)

$T$  és el temps expressat en segons (s).

$$DE = (P \times T)/S$$

↓

$$T = (DE \times S)/P$$

$$DP = P/S$$

On:

$DE$  és la densitat d'energia o fluència expressada en  $J \cdot cm^{-2}$

$P$  és la potència expressada en watts (W)

$T$  és el temps expressat en segons (s)

$S$  és la superfície de l'*spot* expressada en  $cm^2$

$DP$  és la densitat de potència o irradiància expressada en  $W \cdot cm^{-2}$ .

L'energia màxima que un làser pot emetre per unitat de temps es determina per la potència de l'aparell d'emissió, de manera que a major potència menor serà el temps d'emissió necessari per poder alliberar una quantitat determinada d'energia. Cal dir, però, que molts làsers poden variar la seva potència d'emissió, la qual cosa es tradueix en el fet que una mateixa quantitat d'energia pot ser alliberada en temps diferents d'irradiació.

Segons la potència de l'aparell làser, les interaccions amb els teixits biològics són diferents, de manera que els làsers es poden dividir en dos grans grups: làsers d'alta potència i làsers de baixa potència. Segons les normes de l'*American National Standards Institute* (ANSI) els làsers de baixa potència són aquells amb una

potència menor a 1 W (Vélez i col·l., 2008a), tot i que a la pràctica no és una barrera exacta. Es considera que perquè un làser sigui de baixa potència aquest no ha d'escalfar els teixits que irradia i, a la pràctica, a partir de 500 mW, la sensació d'escalfament és evident. Els làsers d'alta potència són els anomenats *tèrmics* i/o *ablatius*; les seves aplicacions estan en el domini de la coagulació, carbonització i vaporització de teixits i estructures. Mentre que en la baixa potència, tenen un efecte biomodulador, ja que actuen a nivell molecular amb repercussió a nivell cel·lular, sense produir canvis tèrmics ni ser termodependents.

### **Paràmetres dosimètrics del làser**

Els principals paràmetres que s'han de tenir en compte quan una cèl·lula o teixit viu són irradiats, al marge de la forma d'irradiació, són (Tunér i Hode, 2002b; Vélez i col·l., 2008b):

- l'estructura irradiada, i la seva situació i profunditat
- la longitud d'ona incident
- l'energia aplicada
- la fluència
- la potència d'emissió
- la irradiància
- la freqüència d'emissió.

**L'estructura irradiada.** L'efecte de la llum làser depèn del teixit amb el qual interactua, on pot ocasionar accions locals i/o sistèmiques (Friedmann i Lubart, 1995; Lubart i col·l., 2006). Així, per exemple, la teràpia làser aplicada a baixa potència en mastòcits biomodula els mecanismes del dolor i aconsegueix disminuir-lo (Trelles i col·l., 1989; El Sayed i Dyson, 1990). Aquesta teràpia fotobiològica aplicada al sistema nerviós central i perifèric, en cicatrius cutànies i cremades, també genera efectes a nivell sistèmic (Rochkind i col·l., 1989).

**Longitud d'ona incident.** Cada cromòfor té una afinitat diferent per a cada longitud d'ona, de manera que per incidir sobre un cromòfor determinat s'haurà d'optar per aquella o aquelles longituds d'ona que, el dit cromòfor, absorbeix més fàcilment, la qual cosa permet usar la radiació làser d'una manera selectiva i poder determinar

així la diana sobre la qual es vol actuar. Tant l'afinitat del cromòfor per una longitud d'ona com la concentració i distribució dels cromòfors en un teixit determinen la capacitat de penetració d'un feix de llum d'una longitud d'ona concreta dins d'un teixit (Trelles i col·l., 2008).

**L'energia aplicada o dosi.** És important, ja que l'LPT pot tenir diferents efectes: a) cap (quan la dosi\* és insuficient), b) estimulants o c) inhibitoris (els efectes inhibitoris es donen principalment quan les cèl·lules són irradiades amb dosis elevades) (Abergel i col·l., 1984; do Nascimento i Callera, 2006; Hawkins i Abrahamse, 2006; Lubart i col·l., 2006; Hourelid i Abrahamse, 2007). Igual que l'energia, la densitat d'energia també és rellevant. Així, do Nascimento i Callera (2006) veieren en cèl·lules progenitores de sang perifèrica criopreservades que els efectes de la irradiació amb un làser de díode de 685 nm eren determinats per la densitat d'energia, de manera que  $1.0 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  augmentava el potencial de creixement de colònies in vitro, mentre que fluències de  $2.0 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  el disminuïen; Bayat i col·l. (2006) mostraren que la irradiació de rates adultes amb cremades de tercer grau amb un làser de HeNe, a diferents fluències, afectava diferentment el calibre dels vasos sanguinis i eren major en els irradiats amb  $1.2 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  si es compara amb els irradiats amb  $2.4 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

**La potència d'emissió.** Com s'ha dit, delimita dos grans blocs d'acció: la baixa potència, amb efectes biomoduladors; l'alta potència, que es caracteritza per efectes de coagulació, desnaturalització de proteïnes, ablació, carbonització i vaporització d'estructures (Trelles i col·l., 2008). És ben sabut en el camp de l'LLL i de l'LPT que tant la potència com la densitat de potència són importants. Azevedo i col·l. (2006) conclogueren que la densitat de potència, en la irradiació de fibroblasts gingivals humans, tenia una influència inversament proporcional en llur creixement; Ilic i col·l. (2006) veieren que la densitat de potència era la variable que determinava un efecte neurològic advers en la irradiació de còrtex de cervells de rates amb un díode de 808 nm d'emissió. Lanzafame i col·l. (2007) conclogueren que els efectes de l'LPT en la irradiació d'úlceres eren determinats per la potència i la irradiància. De totes maneres, aquesta importància encara no ha estat assajada en la irradiació d'esperma.

**La freqüència d'emissió.** Els làsers, segons les seves característiques tècniques, poden emetre en continu o en polsat (Tunér i Hode, 2002a; Vélez i col·l., 2008b). Un exemple de làser d'emissió contínua és el de HeNe, d'entre els d'emissió polsada hi ha el díode d'arsenur de gal·li de 904 nm d'emissió. Un làser d'emissió contínua es pot polsar, mentre que un làser polsat no pot emetre en continu. Aquesta possibilitat de diferent forma d'emissió ha donat lloc a la teoria de les freqüències; és a dir, que segons a la freqüència en la qual emet un làser (Hz), aquest tindrà diferents efectes sobre els teixits biològics. Cal no confondre la freqüència dels polsos amb la freqüència corresponent a la longitud d'ona dels fotons del feix làser (Tunér i Hode, 2002a). Però la teoria de les freqüències encara està per estudiar i demostrar científicament (Corral-Baqués i Rigau, 2002) i no és objecte d'estudi d'aquesta tesi.

Hi ha altres mecanismes pels quals pot actuar la llum sobre l'organisme com ara la teràpia fotodinàmica o més coneguda com a *PDT (Photodynamic Therapy)*, on s'utilitza un cromòfor extern per desencadenar certes reaccions citotòxiques i aconseguir la mort de cèl·lules aïllades. Aquesta tècnica és emprada en el tractament de malalties com el càncer (Stockert i col·l., 2007).

### 1.3. L'ESPERMATOZOIDE

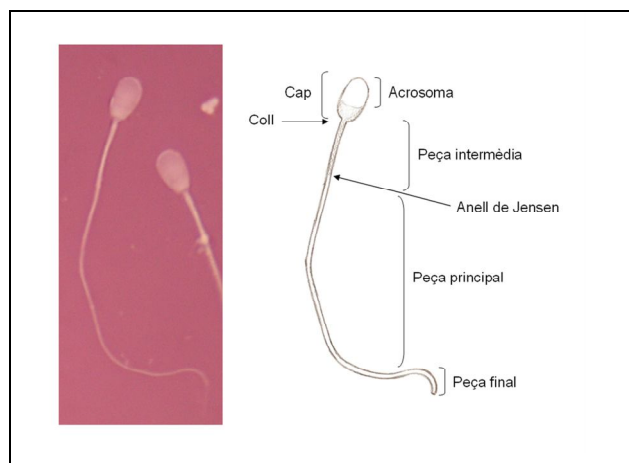
Un *espermatozoide* és una cèl·lula haploide\* i, com a tal, només conté un sol joc de cada cromosoma a diferència de les cèl·lules diploides\*, que en tenen dos. Constitueix el gàmeta masculí en els animals i la seva funció és trobar el gàmeta femení i fecundar-lo després de recórrer una gran distància, per tornar a formar una cèl·lula diploide que donarà lloc a un nou individu després del desenvolupament corresponent del zigot\*. Transporta no sols el genoma, sinó un gran nombre de proteïnes i altres molècules necessàries per a les primeres fases del desenvolupament embrionari (diferents tipus de RNA missatgers, micro-RNA, centrosomes\* i mitocondris) (Ostermeier i col·l., 2002).

Les característiques i activitat de l'espermatozoide varien segons l'espècie. El seu estudi és important a causa de la transcendència, també econòmica, que representa la reproducció, no sols en humans, sinó també en l'animal: la reproducció de races més productives, animals de competició d'elit, espècies en perill d'extinció, etc.

L'espermatozoide (figura 3) és una cèl·lula relativament fàcil d'obtenir en el gos, és format per tres components: el cap, el coll i la cua o flagel\*. L'espermatozoide caní mesura entre 62 i 66  $\mu\text{m}$  de llarg (Feldman i Nelson, 2007). El cap és aplanat dorsoventralment i és constituït pel nucli\*, l'acrosoma\* i, en menor grau, per una petita quantitat de citoplasma i estructures citoesquelètiques. El nucli està format per cromatina altament condensada; l'*acrosoma* és una vesícula secretora que envolta la part apical del nucli i que conté molècules molt diverses com mucopolisacàrids, lípids i proteïnes com la hialuronidasa i l'acrosina, enzims molt importants en el moment de la fecundació\* (Knobil i Neil, 1994). El flagel, de 61 a 61,6  $\mu\text{m}$  de llargària, és filamentós i cilíndric, i és una part funcionalment destacada de l'espermatozoide. En aquest hi resideixen tant la capacitat mòtil\* com la maquinària encarregada de l'obtenció d'energia. El nucli central del flagel és constituït per l'axonema\*, que és molt organitzat en les parts inicials i que es va desorganitzant conforme arriba a l'extrem distal (Ramió, 2009). El flagel és format per la part intermèdia, la part principal i la part final (Russell i col·l., 1990). La part intermèdia és envoltada per una beina mitocondrial responsable del moviment de l'espermatozoide que es produeix per la generació i formació de les ones de doblec, que dóna lloc a aquesta força, i en la propagació de les ones des de la base fins a la punta (Eddy, 1988). La peça principal és la part més llarga del flagel i s'estén des de l'anell de Jensen fins a la peça final, i és envoltada d'una estructura citoesquelètica que li confereix la rigidesa necessària per al moviment. També presenta altres funcions com la fixació de proteïnes implicades en la transmissió de senyals i el de la generació d'energia (Vadnais i col·l., 2007).

La funció de l'espermatozoide és la de lliurar el material genètic masculí a un oòcit\* durant la fecundació; per aquesta raó, la motilitat\* és un dels paràmetres més importants. El flagel és sensible a factors moduladors, tant interns com externs. Koutsarova i col·l. (1997) veieren que la pentoxifil·lina incrementa significativament el percentatge de la motilitat progressiva, tant del semen fresc de gos com del descongelat; Kawakami i col·l. (2001) mostraren que la interacció entre l'esperma caní i les cèl·lules epitelials de l'oviducte, tant en fase fol·licular com lúcia, augmentava els percentatges dels espermatozoides que mostraven moviment actiu de la cua i els espermatozoides hiperactivats fins a 72 hores posteriors a la





**Figura 3.** Fotografia d'espermatozoide caní de morfologia normal amb esquema descriptor de les diferents parts que el componen (tinció vital d'eosina-negrosina, x1000).

coincubació de l'esperma amb les cèl·lules de l'oviducte; i Albarracín i col·l. (2004) veieren que la incubació d'espermatozoides de gos en un medi sense glucosa i en presència de lactat i piruvat durant 4 hores induïa la capacitat\* espermàtica. Des d'un punt de vista funcional, la motilitat està fortament relacionada amb l'habilitat de l'espermatozoide de gestionar l'estat de la seva pròpia energia per a la contractibilitat del flagel (Roldan, 1998); per tant, la modulació de l'estat energètic es podria traduir en canvis significatius en els patrons de motilitat (Rigau i col·l., 2001). Aquests canvis de motilitat es produeixen de manera fisiològica en el seu recorregut pel tracte genital femení durant el procés de la capacitat (Visconti i col·l., 1998).

Perquè un espermatozoide madur\* pugui arribar a fecundar un òvul ha de patir uns canvis bioquímics i fisiològics que permetran que es fusioni amb l'òocit; el conjunt de tots aquests canvis rep el nom de *capacitació*. Aquest procés fisiològicament es dona al tracte genital femení i s'hi donen fenòmens que alteren la fluïdesa de la membrana espermàtica, com canvis en la fosforilació\* dels residus de tirosina, augment de la motilitat espermàtica (hipermotilitat) que acabarà desencadenant la reacció acrosòmica quan el cap de l'espermatozoide contacti amb la zona pel·lúcida de l'òvul (Naz i Rajesh, 2004). La reacció acrosòmica permet la fusió de les membranes d'ambdós gàmetes per aconseguir la fecundació (Pukazhenthil i col·l., 1998; de Jonge, 2005).

### 1.3.1. Anàlisi qualitativa del semen

L'avaluació seminal bàsica es realitza mitjançant valoracions macroscòpiques i microscòpiques. En una valoració macroscòpica se'n determina el volum, el color, l'aspecte i el pH. Amb el microscopi es pot determinar la motilitat, la concentració, la

viabilitat, l'estat de l'acrosoma i la morfologia. Són diverses les tècniques per estudiar la viabilitat, l'estat acrosòmic i les anomalies\* morfològiques (primàries i secundàries), la més habitual és realitzar un frotis amb el semen i tenyir-lo amb un colorant, una de les més clàssiques és la tinció vital d'eosina-nigrosina (Feldman i Nelson, 2007). Hi ha altres tècniques de tinció i tipus de colorants molt precisos per detectar a quin nivell es donen les alteracions, com les tincions amb fluorocroms del nucli, acrosoma i mitocondris; per exemple, el taronja d'acridina informa sobre la integritat del DNA espermàtic (Yeste M., 2008). El fonament de la tinció vital es basa en la capacitat del colorant de penetrar la membrana espermàtica quan aquesta està malmesa, o bé de presentar afinitat per enzims o restes cel·lulars quan la cèl·lula s'està degradant. Els espermatozoides no viables resten tenyits de color porpra per l'eosina, mentre que els viables no es tenyeixen (figura 4). En el cas dels acrosomes, els que estan alterats permeten el pas de l'eosina i es veuen de color porpra o bé,



**Figura 4.** Aparença dels espermatozoides en la tinció vital amb eosina. Els senyalats amb una fletxa negra són aquells que s'han tenyit per no tenir la membrana íntegra (espermatozoides no viables, x1000).

si s'han perdut, no es veuran. El fons del portaobjectes resta tenyit de color rosat gràcies a la nigrosina, d'aquesta manera els espermatozoides viables i els acrosomes intactes que no han reaccionat es veuen blancs. Les anomalies morfològiques es veuen fàcilment contrastades sobre els fons fosc (Zaneveld i Polakoski, 1977).

L'ejaculat del gos s'obté per manipulació manual amb o sense gossa en zel. Es divideix en tres fases d'aspecte ben diferent, emeses successivament i que per ordre són: la fracció uretral, fracció epididimària o espermàtica i fracció prostàtica. A la taula 3 es descriuen les característiques d'un ejaculat normal i complet de gos.

**Principals paràmetres de fertilitat**

- Espermatozoides totals per ejaculat:  $> 200 \times 10^6$
- Motilitat dels espermatozoides:  $> 70 \%$  amb  $> 80 \%$  de motilitat progressiva\*
- Morfologia dels espermatozoides:  $> 70 \%$  espermatozoides normals
  - Anomalies primàries:  $< 10 \%$  dels espermatozoides
  - Defectes secundaris:  $< 20 \%$  dels espermatozoides

**Paràmetres addicionals**

- Volum del semen: variable segona la raça, d'1 a 40 mL/ejaculat
- Color del semen: de més o menys blanc a opalescent i opac
- pH seminal: de 6.3 a 6.7 (fluid prostàtic de 6.0 a 7.4)
- Citologia seminal: ocasionalment cèl·lules epitelials, leucòcits, eritròcits, bacteris
- Fosfatasa alcalina seminal:  $> 5000$  UI/L de plasma seminal

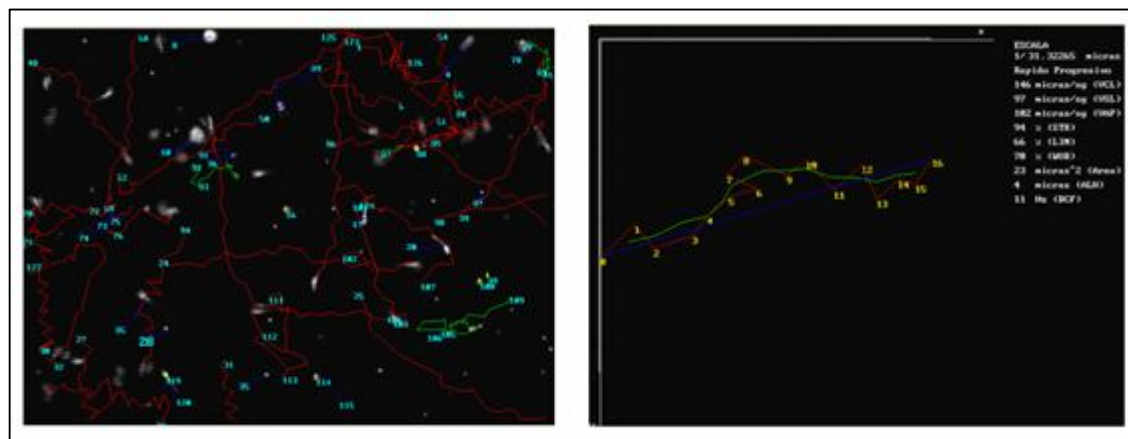
**Taula 3:** Característiques seminals d'un ejaculat fisiològic d'un gos d'edat mitjana (Feldman i Nelson, 2007).

**1.3.2. Anàlisi de la motilitat**

La motilitat és un dels paràmetres importants dins d'una anàlisi de semen rutinari i consisteix a determinar el percentatge d'espermatozoides mòtils i no mòtils, i dels mòtils, quin percentatge presenta una motilitat progressiva\*. Aquesta determinació es pot fer d'una manera objectiva o subjectiva. L'observació directa mitjançant microscopi òptic és un mètode econòmic, fàcil i ràpid de realitzar, però és molt subjectiu i cal experiència per part de l'analista perquè els resultats siguin més o menys fiables.

Des de fa uns anys s'han desenvolupat sistemes automàtics com el *Computer-aided Sperm Analysis* (CASA\*: anàlisi espermàtica assistida informàticament) per avaluar la motilitat espermàtica de diferents espècies, entre aquestes la del gos (Ellington i col·l., 1993; Günzel-Apel i col·l., 1993; Mortimer, 2000; Iguer-Ouada i col·l., 2001a; Iguer-Ouada i col·l., 2001b). Els sistemes automàtics permeten una major objectivitat, sensibilitat i seguretat respecte al mètode visual (Holt i col·l., 1994); de totes maneres, sempre hi ha un cert grau de subjectivitat, ja que és el mateix operari el que fa la selecció dels camps que s'avaluen, així com la neteja de les imatges. La *neteja d'imatges* és el fet d'eliminar tot allò que el programa no ha d'analitzar, aquesta operació inclou eliminar cossos estranys com ara restes cel·lulars, detritus o espermatozoides que xoquen amb els cossos estranys o amb altres

espermatozoides, ja que distorsionen la informació sobre les trajectòries, així com dels diferents paràmetres que s'han d'analitzar. Els components habituals d'un CASA són: un microscopi, una càmera de vídeo per a la captació d'imatges i un ordinador per analitzar les imatges.



**Figura 5.** Exemple de les imatges analitzades per un programa CASA (x200). A l'esquerra, hi ha la determinació de les trajectòries dels diferents espermatozoides que apareixen en un camp, i es mostren les trajectòries realitzades i deduïdes a partir de les 25 imatges preses en un segon; a la dreta, hi ha l'anàlisi individualitzada d'un sol espermatozoide.

El sistema CASA es basa en l'enregistrament del moviment espermàtic, ja que pren un nombre determinat de fotografies per segon que varia en funció del sistema concret usat. La imatge digital del cap de cada espermatozoide pot ser individualitzada i monitoritzat el seu desplaçament al llarg de tota la seqüència d'imatges (figura 5), la qual cosa permet una quantificació precisa del moviment realitzat per cada espermatozoide, durant el temps enregistrat, en forma de diferents paràmetres (vegeu la taula 4 per als diferents paràmetres de motilitat i la figura 6 per veure la representació gràfica dels paràmetres estudiats en aquesta tesi). El programa disposa d'uns rangs establerts de grandàries de caps, de manera que totes aquelles partícules, siguin o no espermatozoides, que estiguin dins dels marges seran considerades com a espermatozoides. Per això, cal que les imatges, abans de ser processades es netegin de tot element que el programa hagi pogut considerar com a espermatozoide sense ser-ho. De la mateixa manera, aquelles partícules que estiguin per sobre o per sota del marge establert no seran considerades pel programari. Cada una de les imatges o dels punts presos de la

Abreujament	Nom	Significat	Unitats
<b>VCL</b>	Velocitat curvilínia	Velocitat mitjana entre imatge i imatge.	$\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
<b>VSL</b>	Velocitat rectilínia	Distància recorreguda per l'espermatozoide entre el primer punt i el darrer de la seva trajectòria en funció del temps.	$\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
<b>VAP</b>	Velocitat lineal	Distància recorreguda per l'espermatozoide al llarg de la trajectòria mitjana en funció del temps.	$\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
<b>LIN</b>	Índex de linealitat	Relació percentual entre la velocitat rectilínia i la velocitat curvilínia: $\text{LIN} = [\text{VSL}/\text{VCL}] \times 100$ .	%
<b>STR</b>	Índex de rectitud	Relació percentual entre la velocitat rectilínia i la velocitat lineal: $\text{STR} = [\text{VSL}/\text{VAP}] \times 100$ .	%
<b>WOB</b>	Índex d'oscil·lació (Wobble)	Relació percentual entre la velocitat lineal i la curvilínia: $\text{WOB} = [\text{VAP}/\text{VCL}] \times 100$ .	%
<b>ALHmed</b>	Amplitud mitjana de desplaçament lateral	Desplaçament que efectuen els caps en la seva trajectòria curvilínia d'un costat a un altre de la trajectòria mitjana o lineal.	$\mu\text{m}$
<b>DNC</b>	<i>Dance</i>	Producte de la velocitat curvilínia per l'amplitud mitjana de desplaçament lateral: $\text{VCL} \times \text{ALHmed}$ .	$\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$
<b>DNM</b>	<i>Dance</i> mitjana	Quocient entre l'amplitud mitjana de desplaçament lateral i l'índex de linealitat.	$\mu\text{m}$
<b>AI</b>	Índex d'angularitat	Valor percentual de l'angle que forma un segment de la trajectòria amb el següent.	%
<b>AV</b>	Velocitat angular mitjana	Producte de la velocitat curvilínia i l'índex d'angularitat dividit entre 100.	$\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
<b>MADabs</b>	Desplaçament angular mitjà absolut	Valor de l'angle d'avançament de l'espermatozoide. És l'angle que forma la direcció d'un segment de la trajectòria i el següent en valor absolut.	$^{\circ}$
<b>MADalg</b>	Desplaçament angular mitjà algebraic	Angle d'avançament de l'espermatozoide. És l'angle que forma la direcció d'un segment de la trajectòria i el següent tenint en compte el signe de l'angle, essent positiu el sentit contrari a les agulles del rellotge.	$^{\circ}$
<b>BCF</b>	Freqüència de batuda del cap	Freqüència amb la qual la trajectòria curvilínia traspasa la trajectòria mitjana en funció del temps.	Hz
<b>HLO</b>	Menor oscil·lació harmònica del cap	Menor valor de l'amplitud de la trajectòria curvilínia respecte de la trajectòria lineal o mitjana.	$\mu\text{m}$
<b>HHI</b>	Major oscil·lació harmònica del cap	Major valor de l'amplitud de la trajectòria curvilínia respecte de la trajectòria lineal o mitjana.	$\mu\text{m}$
<b>HME</b>	Oscil·lació mitjana del cap	Valor mitjà de l'amplitud de la trajectòria curvilínia respecte a la trajectòria lineal o mitjana.	$\mu\text{m}$
<b>HMX</b>	Màxima amplitud de l'oscil·lació del cap	Distància màxima en funció del temps invertit entre dos creuaments successius.	Hz
<b>HBS</b>	Harmònic bàsic de l'oscil·lació del cap	Distància mitjana en funció del temps invertit entre dos creuaments successius.	Hz
<b>H_Y</b>	Amplitud de l'harmònic	Distància mínima en funció del temps invertit entre dos creuaments successius.	Hz
<b>MT</b>	Motilitat total	Motilitat total calculada a partir d'una $\text{VAP} > 20 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	%

**Taula 4.** Relació dels diferents paràmetres de motilitat que pot definir un CASA.

mostra, és analitzada individualment. En el cas de les imatges seriades, l'ordinador cerca, d'una seqüència a una altra, la imatge corresponent del cap i n'estableix la trajectòria de cada un dels espermatozoides fotografiats. Si el sistema es basa en una pista contínua, la trajectòria es traça com la informació integral de la pista (Rivera, 2003).

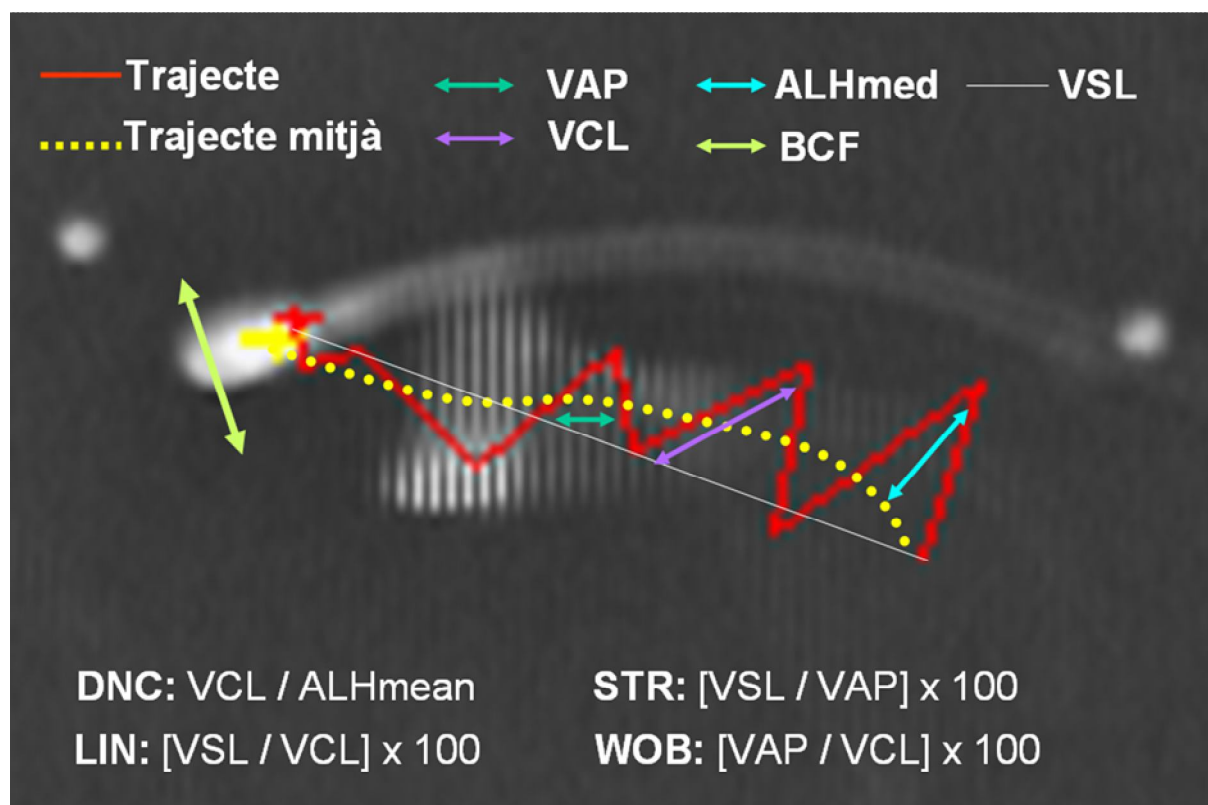
Segons Rigau i col·l. (2001), la motilitat del semen fresc de gos, en situació fisiològica òptima, presenta uns valors de la velocitat lineal d'uns  $65 \mu\text{m/s}$ , un índex de linealitat del 64 %, la *dance* de  $310 \mu\text{m}^2$ , la *dance* mitjana de  $0.05 \mu\text{m}$ , la menor oscil·lació harmònica del cap de  $0.50 \mu\text{m}$  i la freqüència de batuda del cap de 15.5 Hz.

Els resultats obtinguts amb l'anàlisi computeritzada de la motilitat es poden veure afectats per molts factors (Davies i Katz, 1993):

- Diluent
- Temperatura de la mostra
- Concentració de la mostra
- Presència de detritus
- Ajustament dels paràmetres de l'instrumental
- Òptica del microscopi i mètode d'il·luminació
- Tipus i profunditat de la cambra de recompte
- Mètode de recompte
- Ràtio de digitalització
- Llindar de digitalització
- Nombre de punts rastrejats
- Nombre de camps o espermatozoides analitzats
- Algorisme de computació
- Mètodes estadístics
- Infraestructura del laboratori
- Variació entre tècniques
- Variació entre alíquotes

A aquests factors s'hi podrien afegir la anomalies morfològiques del semen.

Com es pot veure, són molts els factors que poden afectar els resultats de la motilitat obtinguts amb el CASA. Així doncs, és fonamental ajustar al màxim els paràmetres del programari a l'hora d'analitzar les trajectòries, i estandarditzar la presa i preparació de les mostres a analitzar.



**Figura 6.** Representació gràfica de les trajectòries espermàtiques i dels paràmetres relacionats estudiats en aquesta tesi, l'únic valor que no s'hi representa gràficament es l'HLO (menor valor de l'amplitud de la trajectòria curvilínia respecte de la trajectòria lineal o mitjana).

Un dels paràmetres que més afecten els resultats de la motilitat és la concentració de la mostra. Nombrosos estudis en l'espècie humana postulen que la concentració ideal no ha de ser inferior a  $20 \times 10^6$  espermatozoides/mL ni superior a  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL (Budworth i col·l., 1988; Gill i col·l., 1988; Mortimer i col·l., 1988; Vantman i col·l., 1988; Neuwinger i col·l., 1990; Davis i Katz, 1993; Holt i col·l., 1994). Per una part, s'ha vist que quan la concentració d'espermatozoides és molt alta el programari confon freqüentment les trajectòries de dos o més espermatozoides que es creuen entre si, fet que donarà resultats erronis del moviment que presenten. Per una altra part, s'ha determinat una relació inversa entre la velocitat lineal (VSL) i la concentració espermàtica (Vantman i col·l., 1988): així, en l'home, la concentració espermàtica que es recomana en aquest tipus d'anàlisi és inferior a  $40 \times 10^6$  espermatozoides/mL (Mortimer i col·l., 1995), i semblant a la que es recomana en el cas del semen de verro, en què la concentració ha de ser inferior a  $35-40 \times 10^6$  espermatozoides/mL (Grant i col·l., 1994). Mentre que en el gos s'utilitza una concentració de  $50$  a  $100 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  (Günzel-Apel i col·l., 1993).

Com s'ha comentat abans, si la mostra presenta moltes restes o detritus que entrin en el rang establert pel programari com caps d'espermatozoides, aquestes poden alterar el resultat final de la motilitat (Davies i Katz, 1993). De totes maneres, hi ha altres autors que assegurin que les variacions del sistema CASA *per se* no són tantes com les que es poden produir entre usuaris (Holt i col·l., 1994).

Un dels grans avantatges que presenta el sistema CASA és la capacitat de proporcionar dades individualitzades de les característiques de motilitat de cada un dels espermatozoides i d'agrupar els espermatozoides formant subpoblacions\*.

Diversos estudis han intentat demostrar una possible relació entre el tipus de moviment dels espermatozoides d'un ejaculat i la seva fertilitat. En el porc, alguns investigadors neguen una relació estrictament lineal entre motilitat i capacitat de fecundació, de manera que el CASA no permet discriminar entre ejaculats de fertilitat superior al 50 % (Vázquez i col·l., 1997). Per contra, en altres espècies, altres autors postulen que les mesures cinètiques detallades del moviment del cap són susceptibles de donar informació útil sobre la integritat general de la membrana i l'axonema, i proporcionar informació predictiva integral sobre la funció espermàtica (Davies i Siemers, 1995).

### **1.3.2.1. Subpoblacions espermàtiques**

El sistema CASA ha permès l'estudi d'altres aspectes de l'esperma que l'observació visual no permet, com la manera que els espermatozoides d'un ejaculat s'estructuren en grups de diferents característiques de motilitat donant lloc a subpoblacions. S'han descrit subpoblacions espermàtiques en molts mamífers, com en el porc (Abaigar i col·l., 1999; Quintero-Moreno, 2003; Quintero-Moreno i col·l., 2004; Rivera i col·l., 2005; Ramió i col·l., 2008), el cavall (Quintero-Moreno, 2003), el cérvol (Martínez-Pastor i col·l., 2005), l'ase (Miró i col·l., 2005) i el conill (Quintero-Moreno, 2003; Quintero-Moreno i col·l., 2007). Això vol dir que no tots els espermatozoides comparteixen els mateixos valors dels diferents paràmetres, sinó que es poden subdividir, dins un mateix ejaculat diferents grups que comparteixen valors de paràmetres similars. L'existència de subpoblacions implica l'existència concomitant d'espermatozoides amb característiques funcionals i fisiològiques diferents en un mateix ejaculat. És més, hi ha serioses evidències que canvis en les



subpoblacions podrien tenir un paper important en l'habilitat de l'ejaculat per fecundar\*, tal com s'ha vist en el cavall (Quintero-Moreno i col·l., 2003).

### 1.3.3. Proves funcionals

Altres tècniques útils en l'anàlisi de la qualitat seminal són aquelles que permeten estudiar la resposta dels espermatozoides a diferents processos físics, químics o metabòlics.

#### 1.3.3.1. Producció de L-lactat

La glucòlisi és una de les formes de metabolitzar la glucosa a piruvat amb la formació d'ATP:



On:

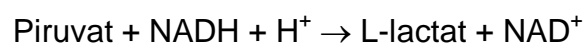
*NAD*<sup>+</sup> és la nicotinamida adenina dinucleòtid

*Pi* és l'ió fosfat

*ADP* és el difosfat d'adenosina

*NADH* és el dinucleòtid de nicotinamida i adenina reduït.

En un ambient anaerobi o deficitari en oxigen, molts organismes reciclen el NADH per regenerar el NAD<sup>+</sup> transferint els electrons del NADH al piruvat amb formació de lactat en una reacció catalitzada pel lactat-deshidrogenasa (Nelson i Cox, 2001).



En el semen fresc la major part de l'energia ve de la glucòlisi, de manera que el ritme de producció de L-lactat és, igual que la motilitat, un avaluador de la capacitat metabòlica de l'espermatozoide (Rigau i col·l., 2002). Els avantatges que presenta la producció de L-lactat respecte de la motilitat és que no es veu tan afectat per agents externs i és de total objectivitat (Rigau i col·l., 1996). En el porc, s'ha pogut determinar l'existència d'una correlació elevada entre el ritme de producció de L-lactat i els percentatges de viabilitat, acrosomes alterats, motilitat total i test de

resistència osmòtica (ORT). Així mateix, també s'ha trobat una elevada correlació entre la producció de L-lactat i el quocient entre el nombre de parts i el nombre d'inseminacions (Rigau i col·l., 1996).

### 1.3.3.2. Resistència osmòtica

Les membranes biològiques ofereixen diferents possibilitats en relació amb els diferents soluts; per aquesta raó, les membranes biològiques són considerades com a semipermeables, perquè permeten el pas d'algunes petites molècules i eviten el pas de les grans (Sten-Knudsen, 2002). La pressió osmòtica de la majoria dels fluids corporals és similar a una solució aquosa isotònica de 0.9 % de clorur sòdic (NaCl) i és similar a la del plasma sanguini, que és d'uns 300 mOsm·Kg<sup>-1</sup> (Yeste, 2008). La solució osmòtica conté dues molècules iòniques (NaCl i citrat sòdic) i una de no iònica (glucosa o fructosa) (Rigau i col·l., 2001; Pommer i col·l., 2002; Agca i col·l., 2002).

Les proves de resistència osmòtica són de diversos tipus que varien en llur aplicació i en l'estructura espermàtica que s'afecta en la prova. En aquesta recerca s'ha emprat el test d'endosmosi (*Hypoosmotic Swelling test*, HOST). Aquesta prova avalua la capacitat funcional dels espermatozoides, els quals, en ser sotmesos a un ambient hipoosmòtic, s'inflen per provar d'equilibrar la pressió osmòtica interna amb la del medi extracel·lular. Quan la membrana cel·lular és íntegra i funcional, aquesta entrada massiva de líquid fa que les cues en inflar-se es dobleguin. Per tant, el percentatge de cues inflades és directament proporcional a la qualitat seminal. La resposta al HOST depèn de la funcionalitat de la membrana i del temps d'emmagatzemament (Jeyendran i col·l., 1992; Kumi-Diaka i Badtram, 1994; Rodríguez-Gil i col·l., 1994), ja que l'inflat de les cues és un procés actiu controlat per les bombes osmòtiques. Això s'ha demostrat en gossos i cavalls, per als quals la inhibició específica d'alguna d'aquestes bombes, com ara l'ATPasa dependent de Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup> i l'antiporter de Na<sup>+</sup> i H<sup>+</sup> alteren significativament la resposta al HOST (Rodríguez-Gil i col·l., 1994; Caiza de la Cueva i col·l., 1997a, b, c).

Aquesta prova es va aplicar inicialment en l'home (Zaneveld i col·l., 1990; Jeyendran i col·l., 1992; Van den Saffelle i col·l., 1992) i s'ha aplicat a la resta d'animals domèstics com, per exemple, en el porc (Vázquez i col·l., 1997), en el toro (Correa i Zavos, 1994; Correa i col·l., 1997), en el gos (Kumi-Diaka, 1993; England i Plummer, 1993; Rodríguez-Gil i col·l., 1994; Kumi-Diaka i Badtram, 1994) i en el cavall (Von

Buiten i col·l., 1989; Caiza de la Cueva, 1998; Pommer i col·l., 2002). S'ha trobat una correlació positiva entre el xoc hipoosmòtic i la fertilitat en el porc (Pérez-Llano i col·l., 2001; Yeste, 2008; Gadea, 2005).

### **1.3.3.3. Fosforilació / desfosforilació de la tirosina**

A nivell cel·lular moltes reaccions metabòliques passen per la fosforilació/desfosforilació dels residus de tirosina de les proteïnes, i es regulen d'aquesta manera diversos processos com el creixement cel·lular, el control del cicle cel·lular, l'assemblatge del citoesquelet, la modulació del corrent iònic i la regulació de receptors (Hunter, 2000; Pawson, 2004). Aquestes reaccions es poden donar en tres aminoàcids diferents (serina, treonina i tirosina), en els quals s'hi poden enganxar fosfats. D'aquests aminoàcids, el més important és la tirosina, la qual dona lloc a canvis conformacionals que són responsables de l'activació o inactivació de les proteïnes afectades. Tal és la importància de la fosforilació de la tirosina que pot ser l'indicador primari o exclusiu d'una via de transmissió de senyal en la cèl·lula (Naz i Rajesh, 2004). S'ha vist que en la major part de les espècies, llevat del porc, l'òrganul major de l'espermatozoide que mostra fosforilació de la tirosina és el flagel (Petrunkina, 2001). S'ha vist que en els espermatozoides la tirosina fosforilada és responsable de la regulació de la motilitat i intervé en el processos metabòlics que acaben donant lloc a la capacitació espermàtica (Visconti i col·l., 1998; Mahony i Gwathmey, 1999; Nassar i col·l., 1999; Tardif i col·l., 2001; Naz i Rajesh, 2004; Dubé i col·l., 2005; Vadnais i col·l., 2007). La detecció de canvis de fosforilació de la tirosina en espermatozoides irradiats amb làser que han experimentat canvis de motilitat podria indicar a quin nivell actuen els fotons o el camp electromagnètic per donar lloc a aquests canvis.

### **1.3.4. Les espècies reactives de l'oxigen (ROS)**

Els processos metabòlics de les cèl·lules aeròbies donen lloc a la producció d'espècies reactives d'oxigen (*Reactive Oxygen Species*, ROS). D'entre les principals ROS podem destacar l'oxigen singlet ( $^1\text{O}_2$ ), el superòxid ( $\text{O}_2^-$ ), els peròxids (R-OOH), el peròxid d'hidrogen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), els òxids de nitrogen (NOs) i el radical hidroxil ( $\text{OH}$ ). Una característica comuna a aquestes ROS és la seva capacitat de

reacció. En funció de llur concentració tenen diferents efectes, a baixes concentracions intervenen en processos de senyalització cel·lular i regulació metabòlica, mentre que altes concentracions poden arribar a donar mutacions i mort cel·lular (Aitken i col·l., 1998; Moustafa i col·l., 2004; Naz i Rajesh, 2004; Valko i col·l., 2004; Nakabeppu i col·l., 2006; Valko i col·l., 2007; de Lamirande i O'Flaherty, 2008).

Els espermatozoides també són cèl·lules aeròbies i, per tant, produeixen ROS (Brouwers i col·l., 2005). En el seu cas, la principal formació de ROS es dona bàsicament als mitocondris i secundàriament a la membrana plasmàtica (Agarwal i col·l., 2005). Els nivells de ROS tenen una influència sobre la fisiologia de l'espermatozoide, podrien jugar un paper en la regulació de la capacitació com s'ha vist en l'esperma humà i porcí; així com en la fosforilació de la tirosina proteica (Aitken i col·l., 1996; Leclerc i col·l., 1997; Tardif i col·l., 2001; de Lamirande i O'Flaherty, 2008). Uns nivells baixos de ROS en un ambient normal desencadena la hiperactivació, la capacitació i la reacció acrosòmica de l'espermatozoide en el tracte genital femení, mentre que in vitro una formació elevada de ROS en espermatozoides dona lloc a un deteriorament espermàtic (Brouwers i col·l., 2005); també s'ha vist que poden disminuir la motilitat espermàtica (Armstrong i col·l., 1999) i bloquejar la fusió de l'espermatozoide a l'oòcit (Mammoto i col·l., 1996).

## 1.4. IRRADIACIÓ LÀSER

### 1.4.1. Precedents de la irradiació d'espermatozoides amb làser

Igual que altres teixits, el semen també ha estat irradiat amb làser, encara que principalment el làser s'ha usat amb la funció de pinça òptica per immobilitzar els espermatozoides (Mushayandebvu i col·l., 1995; König i col·l., 1996; Liu i col·l., 1996; Ebner i col·l., 2002; Shao i col·l., 2006; Shi i col·l., 2006; Xu i col·l., 2007; Nascimento i col·l., 2008a; Nascimento i col·l., 2008b; Vandewoestyne i col·l., 2009). Altres grups de recerca han trobat que la irradiació d'esperma amb diferents longituds d'ona afecta el transport de  $Ca^{2+}$  (Lubart i col·l., 1992a; Breitbart i col·l., 1996; Lubart i col·l., 1997; Cohen i col·l., 1988).

Hi ha pocs estudis sobre l'ús del làser amb la finalitat de biomodulació espermàtica. El 1984 Sato i col·l. estudiaren l'efecte de la irradiació amb làser de criptó de 647 nm

de longitud d'ona sobre la motilitat i la velocitat de l'esperma humà, usant l'exposició fotogràfica múltiple, i van veure que la motilitat total espermàtica augmentà després de la irradiació làser a  $4 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ,  $8 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  i a  $32 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ , però no demostraren que influenciés en la velocitat espermàtica; el mètode usat no permetia realitzar les mesures acurades del sistema CASA com individualitzar els diferents paràmetres de la motilitat espermàtica i molt menys estudiar l'existència de subpoblacions. També cal remarcar la tesina de Marín i Vélez (1990) sobre els efectes de la irradiació, amb un làser de HeNe d'espermatozoides de toro. Aquests autors van trobar un augment de la motilitat d'entre un 10 % i un 20 % entre els 5 i els 10 minuts postirradiació de 4, 8 i  $12 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . No observaren cap efecte significatiu de la irradiació làser en els índexs de supervivència de l'esperma comparat amb el control. Malauradament aquest estudi no proporcionava suficient informació de les característiques del làser usat ni en la forma d'irradiació i no s'usaren tècniques objectives d'avaluació com el CASA.

Notòriament, els efectes de la irradiació dels espermatozoides sembla que varien segons les espècies estudiades; d'aquesta manera, la irradiació augmentà la longevitat del semen emmagatzemat de paó (Iaffaldano i col·l., 2005). Zan-Bar i col·l. (2005) treballant amb marrà i tilàpia del Nil trobaren que mentre que el semen de tilàpia mostrava una major motilitat i fertilitat després de la irradiació amb llum vermella (660 nm) i llum blanca (400-800 nm), en l'esperma de marrà la motilitat i la fertilitat només augmentaven lleugerament amb la llum vermella. A més, en ambdues espècies la irradiació amb llum ultraviolada (294 nm) i llum violeta (360 nm) induí un efecte negatiu, tant en la motilitat com en la fertilitat. En el moment de la redacció d'aquesta tesi s'acaba de publicar un article de Iaffaldano i col·l. (2010), on es descriu que l'esperma de conill irradiat amb un làser de HeNe manté la seva motilitat a les 24 hores i a les 48 hores postirradiació, i augmenta la integritat acrosòmica, així com la seva viabilitat significativament respecte del control. La dosi que ha mostrat un major efecte bioestimulador és la de  $6.12 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  i els efectes del HeNe són mitjançant l'estimulació de la cadena respiratòria dels mitocondris espermàtics, la qual cosa fa que augmenti la capacitat de supervivència de l'esperma de conill a les condicions d'emmagatzematge en líquid. Tots aquests resultats diferents indiquen que encara som lluny d'un coneixement profund dels efectes de l'LPT sobre els espermatozoides.



## **HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DíODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES

Marc-Ignasi Corral-Baqués

ISBN/ DL:T.1240-201

*Resposta de la motilitat espermàtica a la irradiació amb làser de díode de 655 nm d'emissió*

## **2. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS**

La hipòtesi d'estudi de la present recerca és que l'energia làser afecta la motilitat dels espermatozoides i que aquesta afectació està relacionada tant amb la dosi com amb la potència d'emissió làser. Per dur a terme aquest treball s'ha marcat un objectiu general i uns objectius específics que han determinat els experiments a realitzar.

### **2.1. Objectiu general**

Estudiar altres usos del làser que tinguin aplicacions pràctiques en la biologia reproductiva, a partir de l'objectivació de l'acció modulant d'un làser de 655 nm d'emissió contínua sobre la motilitat espermàtica.

### **2.2. Objectius específics**

1. Comprovar si la motilitat del semen de gos respon a l'energia làser.
2. Identificar que la resposta al làser és dosi dependent.
3. Cercar els límits superior i inferior de dosi d'irradiació moduladora.
4. Determinar si la motilitat i/o la distribució de les subpoblacions espermàtiques també es veuen afectades per la radiació làser i per la potència d'emissió.
5. Comprovar si l'efecte làser damunt les subpoblacions és dosi dependent.
6. Establir si l'acció làser és relacionada amb la fosforilació de la tirosina.
7. Determinar si el mecanisme d'acció del làser es produeix mitjançant les espècies reactives d'oxigen (ROS).



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DíODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES

Marc-Ignasi Corral-Baqués

ISBN/ DL:T.1240-201

*Resposta de la motilitat espermàtica a la irradiació amb làser de díode de 655 nm d'emissió*



# MATERIAL I MÈTODES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DíODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES

Marc-Ignasi Corral-Baqués

ISBN/ DL:T.1240-201

*Resposta de la motilitat espermàtica a la irradiació amb làser de díode de 655 nm d'emissió*

### 3. MATERIAL I MÈTODES

La justificació del model d'estudi es desenvolupa dins el capítol de la Discussió.

#### 3.1. Model d'estudi

Per a aquesta recerca s'ha treballat amb mostres d'esperma caní procedents de 10 mascles de la raça Beagle, amb una edat mitjana de 5.8 anys  $\pm$  2.1 SD de les gosses experimentals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona (vegeu taula 5). Els gossos es mantingueren sempre sota el règim normal d'estabulació (Servei de Granges i Camps Experimentals de la UAB número de registre de la Generalitat B9900092) d'acord amb la normativa de benestar animal. La recerca amb animals es va fer seguint la Llei 5/1995, de 21 de juny, de la Generalitat de Catalunya, de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i per a altres finalitats científiques. Els protocols han estat aprovats per la comissió ètica de la UAB i de la Generalitat de Catalunya (00227).

Sèries experimentals	Ejaculats	Gossos diferents	Edat $\pm$ SD
SE1	8	4	5,6 $\pm$ 0.5
SE2	8	4	6,5 $\pm$ 1.4
SE3	11	3	5,4 $\pm$ 2.3
SE4	21	5	6,5 $\pm$ 1.9
SE5	7	3	5,4 $\pm$ 4.3
<b>Totals</b>	55	10	5,9 $\pm$ 2.1

**Taula 5.** Relació de les mostres utilitzades en cada sèrie experimental, nombre d'ejaculats, nombre de gossos diferents i edat.

#### 3.2. Sèries experimentals

Per a la present recerca es dissenyaren cinc sèries experimentals (SE):

**Sèrie experimental 1 (SE1) (Dosi d'estimulació espermàtica).** Comprovar si el semen de gos respon a la llum làser amb diferents dosis d'irradiació, i determinar els possibles canvis de motilitat i funció (treballa els objectius específics 1 i 2).

**Sèrie experimental 2 (SE2) (Rang d'afectació espermàtica per làser).** Cercar la dosi límit d'irradiació superior i inferior, en què l'esperma de gos continua mostrant

alguna resposta i si afecta l'estructura de les subpoblacions espermàtiques (treballa els objectius específics 3, 4 i 5).

**Sèrie experimental 3 (SE3) (Determinació de la tirosina fosforilada).** Veure si el mecanisme d'acció del làser està relacionat amb la fosforilació de la tirosina (treballa l'objectiu específic 6).

**Sèrie experimental 4 (SE4) (Determinació de la influència de la potència d'emissió).** Irradiació del semen amb la dosi que ha mostrat un major nombre de diferències significatives respecte del control en la SE1 a diferents potències d'emissió, per veure si aquestes poden influir en la resposta esperada (treballa l'objectiu específic 4).

**Sèrie experimental 5 (SE5) (Determinació d'espècies reactives d'oxigen).** Determinació dels nivells de les ROS d'origen mitocondrial en els espermatozoides irradiats (treballa l'objectiu específic 7).

### 3.3. Obtenció de les mostres

Les mostres es van obtenir per estimulació manual i es recolliren en flascó de vidre i es protegiren de la radiació lumínica ambiental, especialment del sol. Les tres fraccions de l'ejaculat (preespermàtica, fracció rica en espermatozoides i fracció prostàtica) es recolliren separatament, i en l'experimentació i l'avaluació només es va utilitzar la fracció rica en espermatozoides (Feldman i Nelson, 2007).

Un cop arribada la mostra al laboratori s'observava, microscòpicament, la motilitat. Es calculava la concentració de la mostra fent una dilució a l'1:100 amb citrat formulat (2.9 g de citrat sòdic en 100 ml d'aigua destil·lada que un cop fet i enrasat se li substitueixen 4 ml de la solució per 4 ml de formol) i realitzant el recompte en una cambra de recompte d'hematologia. Al mateix temps, es feia un frotis que es tenyia amb eosina-nigrosina per determinar la qualitat espermàtica i descartar els mascles amb baixa qualitat seminal.

### 3.3.1. Preparació de les mostres

Les mostres tenien més de 200 milions d'espermatozoides per mL i, independentment de la concentració, es diluïen fins a 5 mL amb sèrum fisiològic, llevat de la SE1 on es diluï en una solució de Krebs sense glucosa; el canvi de diluent es degué a que els espermatozoides diluïts amb Krebs tendien a adherir-se al vidre tant del portaobjectes com del cobreobjectes, mentre que amb el sèrum fisiològic no s'observà aquesta tendència.

Cada mostra es repartia en flascons per a fluorescència on s'hi dipositava 1 mL de la mostra diluïda. Els pots s'utilitzaven a l'atzar, un com a control sense irradiar i els altres per a cada variable d'irradiació, dosi o potència d'emissió. Durant els experiments els flascons es preservaven en una capsa de poliestirè expandit (Porexpan<sup>®</sup>) tapada amb una cartolina negra finestrada per evitar la radiació ambiental de les mostres i permetre l'obtenció ràpida de material per a las mesures necessàries al llarg de l'experiment.

En la SE3 i la SE5 es treballà amb un *pool* d'ejaculats.

### 3.4. Font làser

La font de llum emprada va ser un làser de díode d'emissió contínua de 655 nm de longitud d'ona construït expressament per a ús experimental (SORISA, Barcelona) (figura 7), amb una potència de sortida variable de 5 mW fins a 53 mW i una àrea de secció del feix (*spot*) de 0.56 cm<sup>2</sup>.



**Figura 7.** Làser de díode d'emissió contínua de 655 nm de longitud d'ona de potència de sortida variable mesurada de 5 – 53 mW i un *spot* de 0.56 cm<sup>2</sup> (SORISA, Barcelona) emprat en la present recerca.

### 3.5. Irradiació de les mostres

Es tingueren en compte les condicions del laboratori: les finestres es taparen per evitar la llum solar directa, la temperatura de treball es mantingué entre els 23° C i els 27° C i es treballà sense música ambiental (Hillman, 1964; Hillman, 1996).

Per assegurar l'estabilitat d'emissió de l'aparell, aquest es posava en marxa 15 minuts abans de mesurar la seva potència mitjana de sortida (la mesura es feia al principi de cada sessió). La mesura de la potència d'emissió es realitzava amb un mesurador *High Sensitivity Thermal Sensor* connectat a un Coherent® FieldMaster/GS (vegeu la figura 8) cedit per SORISA.



**Figura 8.** Equip de mesura de la potència d'emissió làser emprat: *High Sensitivity Thermal Sensor* connectat a un Coherent® FieldMaster/GS.

Abans d'irradiar i amb la mesura presa de la potència de sortida del làser, es calculava els temps d'irradiació necessaris per a les dosis motiu d'estudi, en funció de la superfície d'incidència i la potència d'emissió del làser mesurat a 4.5 cm de la fibra (que corresponia a la distància a la qual s'havien d'irradiar les mostres).

En la SE1 cada mostra es dividí en quatre alíquotes: un control no irradiat (D0) i els altres tres s'irradiaren, respectivament, amb 4, 6 i 10 J·cm<sup>-2</sup>, anomenats, respectivament, D4, D6 i D10 (taula 6).

Alíquota	DE (J·cm <sup>-2</sup> )	P <sub>m</sub> (mW)	Spot (cm <sup>-2</sup> )	DP (mW)	T(s)	E <sub>T</sub> (J)
D0	0	0	0	0	0	0
D4	4	21.7	0.56	38.75	103	2.2
D6	6				154	3.3
D10	10				258	5.6

**Taula 6.** Paràmetres d'irradiació de la sèrie experimental 1 emprats per irradiar cada alíquota, segons la potència i l'*spot*, a partir de les dades mitjanes de tots els experiments. On *DE* és la densitat d'energia, la *P<sub>m</sub>* és la potència mitjana d'irradiació, *DP* és la densitat de potència, *T* és el temps d'irradiació i *E<sub>T</sub>* és l'energia total irradiada.

En la SE2 cada mostra es dividí en quatre alíquotes: un control sense irradiar (D0) i la resta per ser irradiats a 2, 12 i 16 J·cm<sup>-2</sup>, anomenats, respectivament, D2, D12 i D16 (taula 7).

Alíquota	DE (J·cm <sup>-2</sup> )	P <sub>m</sub> (mW)	Spot (cm <sup>-2</sup> )	DP (mW)	T(s)	E <sub>T</sub> (J)
D0	0	0	0	0	0	0
D2	2	30	0.56	53.57	37	1.1
D12	12				220	6.6
D16	16				293	8.8

**Taula 7.** Paràmetres d'irradiació de la sèrie experimental 2 per irradiar cada alíquota, segons la potència i l'*spot*, a partir de les dades mitjanes de tots els experiments. On *DE* és la densitat d'energia, la *P<sub>m</sub>* és la potència mitjana d'irradiació, *DP* és la densitat de potència, *T* és el temps d'irradiació i *E<sub>T</sub>* és l'energia total irradiada.

En la SE3 la mostra s'irradià amb la dosi que mostrà més diferències respecte del control en la SE1 i que fou la de 3.34 J d'energia total a una potència mitjana de sortida de 22.14 mW. Els resultats es comparen amb el control no irradiat.

En la SE4, cada mostra es dividí en cinc alíquotes: un control (sense irradiar) anomenat P0 i la resta per ser irradiats amb 3.34 J d'energia total donada a diferents potències: 6.8 mW, 15.4 mW, 33.1 mW i 49.7 mW, anomenats, respectivament, P7, P15, P33 i P50 (taula 8). La dosi irradiada fou la que mostrà un major nombre de diferències significatives respecte del control en la SE1.

Alíquota	E <sub>T</sub> (J)	P <sub>m</sub> (mW)	DP (mW)	T(s)
P0	0	0	0	0
P7	3.34	6.8	12.1	491
P15		15.4	27.5	217
P33		33.1	59.1	101
P50		49.7	88.8	67

**Taula 8.** Paràmetres d'irradiació de la sèrie experimental 4 per irradiar cada alíquota, segons la potència i l'*spot*, a partir de les dades mitjanes de tots els experiments. On *E<sub>T</sub>* és l'energia total irradiada, la *P<sub>m</sub>* és la potència mitjana d'irradiació, *DP* és la densitat de potència i *T* és el temps d'irradiació.

En la SE5, les mostres a ser tractades s'irradiaren amb una energia total de 3.34 J, però a una potència mitjana de sortida de 6.8 mW i 49.7 mW, que corresponien a les



potències P7 i P50, respectivament, de la SE4 que es compararen amb el grup control no irradiat P0.

En tots els casos les irradiacions es feren zenitalment dins d'una cambra fosca i amb una cubeta per espectrofotometria oberta, i se situava la fibra que conduïa el feix làser sobre la vertical del centre de la cubeta a nivell del seu marge superior, de manera que l'àrea d'incidència del feix làser coincidia amb la superfície de la base de la cavitat de la cubeta.

### **3.6. Avaluació computeritzada de la motilitat (CASA)**

L'anàlisi de la motilitat seminal, en la SE1, es va fer mitjançant el sistema CASA, el programari usat fou *Sperm Class Analyzer V5.0* (Microptic<sup>®</sup>, Barcelona) que capturava 16 imatges per segon. Per a la SE2 i la SE4 es va usar un altre programari més avançat, el SCA2002 (Proiser<sup>®</sup> S. L., València, Espanya) que prenia 25 imatges en un segon.

El sistema estava format per un microscopi de contrast de fases connectat a una platina escalfable a 37 °C. Al microscopi hi havia connectada una càmera de vídeo d'alta resolució, la qual estava connectada a un ordinador (figura 9).

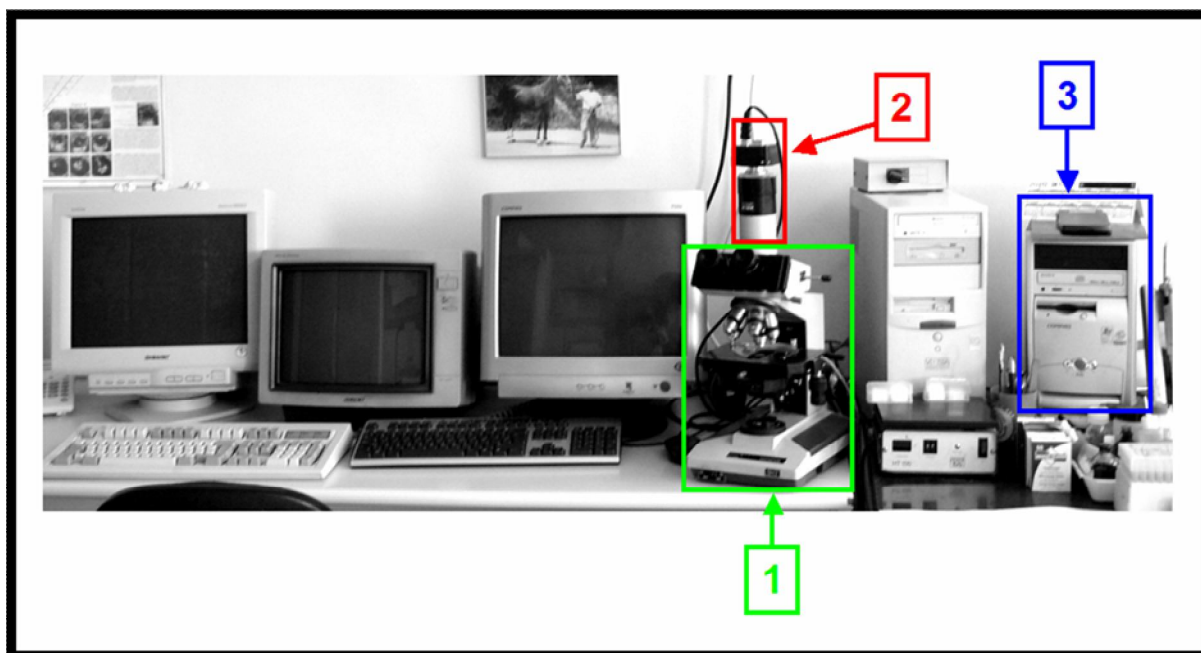
Per a la presa d'imatges s'agafava una gota (10 µL) de semen diluït fins a una concentració màxima d'uns 70 a 100 espermatozoides per imatge, es dipositava sobre un portaobjectes escalfat a 37 °C i es cobria amb un cobreobjectes de 24 x 24 mm. La presa d'imatges es realitzava a x200 augments i amb contrast de fase negatiu.

En la SE1 de cada un dels 4 grups diferents (D0, D4, D6 i D10) es prengueren dues imatges al temps 0, 15, 30 i 45 minuts. Per a la segona i quarta sèries experimentals les imatges es prengueren al temps 0 per al control, i tot just després de la irradiació (temps 00) i als 45 minuts.

### **3.7. Determinació de la viabilitat dels espermatozoides**

Per determinar el percentatge de viabilitat i l'estat dels acrosomes dels espermatozoides, es va emprar la tinció vital d'eosina-nigrosina (Zaneveld i Polakoski, 1977), l'eosina de la casa Panreac<sup>®</sup> i la nigrosina de la casa Merck<sup>®</sup>. Per realitzar aquesta prova, es prenen 10 µL de la mostra a estudi i 10 µL de colorant

d'eosina-nigrosina que es barrejaven sobre un portaobjectes calent i, posteriorment, se'n feia l'extensió. Un cop assecat el frotis es comptaven 200 espermatozoides per mostra a x1000 augments. Aquesta anàlisi es féu en arribar el semen al laboratori (corresponent al semen control) i als 15 minuts a totes les mostres (irradiades i no irradiades), aquest procediment es realitzà a la SE1, la SE2 i la SE4.



**Figura 9.** Muntatge del CASA utilitzat on s'hi poden identificar els diferents elements que l'integren: 1) microscopi de contrast de fase, 2) càmera de vídeo d'alta resolució, 3) ordinador amb programari d'anàlisi d'imatges.

En la SE3 i la SE5 no es determinà la viabilitat, ja que els paràmetres que s'hi empraren ja s'havien utilitzat anteriorment i la viabilitat no se n'havia vist afectada.

### 3.8. Test de resistència osmòtica

El HOST es va realitzar segons la tècnica descrita per Rodríguez-Gil i col·l. (1994). El HOST es va fer afegint 100  $\mu\text{L}$  de semen a 900  $\mu\text{L}$  de medi hipoosmòtic i el mateix es va fer amb medi isoosmòtic, tot el procés es realitzà a 37  $^{\circ}\text{C}$ . El medi isoosmòtic (pressió osmòtica de  $p = 300 \pm 15$  mOsm, valor mitjà  $\pm$  SEM de 7 determinacions) es va preparar amb 2.7 % (w/v) de fructosa, 1.47 % (w/v) de citrat sòdic enrasat amb aigua destil·lada fins als 100 mL. El medi hipoosmòtic ( $\pi = 150 \pm 20$  mOsm, valor mitjà  $\pm$  SEM de 7 determinacions) contenia fructosa a l'1.3 % (w/v) i citrat sòdic dihidratat al 0.7 % (w/v) (Rodríguez-Gil i col·l., 1994). La barreja es va mantenir a 37  $^{\circ}\text{C}$  durant 15 minuts. Per concentrar els espermatozoides de la mostra, aquesta

es va centrifugar a 3000 *g* durant 5 minuts, i s'eliminà el sobrenedant i el sediment cel·lular; es va rediluir amb una mica de sobrenedant i, seguidament, es va fer un frotis que es va tenyir amb la tinció vital d'eosina-nigrosina. Per a l'avaluació es comptaren 200 espermatozoides per mostra. El percentatge de cues doblegades es va calcular mitjançant el test de les cues veritablement doblegades (TST) segons Rodríguez-Gil i col·l. (1994):

$$\text{TST (\%)} = (([\text{HTS} - \text{ITS}] \times \text{HV}) / \text{IV}) \times 100$$

On:

*TST* és el percentatge de cues veritablement doblegades

*HTS* és el percentatge de cues inflades en el medi hipoosmòtic

*ITS* és el percentatge de cues inflades en el medi isoosmòtic

*HV* és el percentatge d'espermatozoides viables en el medi hipoosmòtic

*IV* és el percentatge d'espermatozoides viables en el medi isoosmòtic.

### 3.9. Determinació del ritme de formació de L-lactat

La determinació del ritme de formació de L-lactat es va realitzar segons la tècnica descrita per Rodríguez-Gil i Rigau (1995): 100  $\mu\text{L}$  de semen amb 900  $\mu\text{L}$  de medi isoosmòtic, s'incubaren a 37 °C durant 1 hora; s'utilitzà la mateixa solució isoosmòtica que s'emprà en el test de resistència osmòtica. A continuació, el medi es centrifugà durant 3 minuts a 3000 *g* i se'n separà el sobrenedant, i el sediment cel·lular (pellet) es va rediluir en 50  $\mu\text{L}$  d'aigua destil·lada i es congelà a -4 °C, el sobrenedant també recollit es congelà en les mateixes condicions.

Per poder relacionar la quantitat de L-lactat obtinguda amb la concentració d'espermatozoides de la mostra, es va determinar la proteïna que hi havia en el pellet. La quantitat de proteïna es determinà a partir del pellet centrifugat a 3000 *g* durant 20 minuts, mitjançant la tècnica descrita per Bradford (1976). Es va utilitzar el *Bio-Rad Assay Kit*<sup>®</sup> (Bio-Rad Laboratories). La quantitat de L-lactat es va determinar a partir del sobrenedant de les mostres de semen, usant-se el mètode enzimàtic descrit per Noll (1984) mitjançant l'autoanalitzador Cobas Bio<sup>®</sup> (Roche Biomedicals, Basilea, Suïssa). La producció de L-lactat s'expressa en  $\mu\text{mol}$  de L-lactat/mg de proteïna x 60 minuts.

### 3.10. Anàlisi estadística

A partir de les dades obtingudes de l'anàlisi de les imatges amb el sistema CASA es varen analitzar les característiques de motilitat dels espermatozoides. Les dades obtingudes en els diferents experiments es processaren mitjançant el paquet CASA estadístic *Statistical Analysis System* (SAS<sup>®</sup>, Institute Inc.; Gary, NC, EUA, 1982).

En la SE1, donada la gran quantitat de variables que oferia el programa informàtic *Sperm Class Analyzer V5.0* de cada un dels espermatozoides, 21 paràmetres diferents, es realitzà una anàlisi estadística prèviament per determinar quins paràmetres donaven més informació. El tractament estadístic escollit fou una anàlisi jeràrquica de conglomerats (*cluster analysis*) per correlacions successives, i es va usar per a això el procediment VARCLUS inclòs en el paquet estadístic SAS<sup>®</sup>. Aquest procediment agrupa els paràmetres de l'estudi en diversos conglomerats segons la correlació que hi ha entre aquests. Tenint en compte els resultats obtinguts amb el procediment VARCLUS, es triaren aquelles variables la correlació de les quals, amb el mateix conglomerat, era la més alta i, a la vegada, tenia una ràtio entre conglomerats més baixa (taula 9). Les variables triades foren: VAP, LIN, ALHmed, DNC i HLO; com a excepció també es prengué la BCF, que no presentava una correlació elevada amb cap conglomerat, la qual cosa feia que cap altre paràmetre englobés estadísticament els seus resultats (Rivera, 2003).

En la SE1, amb les mitjanes dels diferents paràmetres, es féu una anàlisi de la variància mitjançant el model lineal generalitzat (GLM) inclòs en el paquet estadístic SAS<sup>®</sup> per determinar l'existència de diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ). Aquest procediment determina l'existència o no de diferències significatives, però no especifica en quin punt es troben les dites diferències; per determinar on es trobaven les diferències es va aplicar el procediment LS-MEANS (Rivera, 2003). En la SE1 s'analitzà la motilitat d'un total de 2863 espermatozoides.

En la SE2 i la SE4 també es va utilitzar el paquet estadístic SAS<sup>®</sup>. Es va aplicar el procediment NORM PLOT per determinar quins paràmetres seguien una distribució normal; aquest procediment aplica el test de Komogorov-Smirnov. Aquells paràmetres no normals es van transformar per normalitzar\*-los abans d'aplicar els diferents procediments estadístics. A més, en la SE2 i la SE4 es va aplicar el procediment estadístic *Fast Cluster Analysis* (FASTCLUS) per distribuir cada espermatozoide mòtil en una subpoblació concreta. Aquest procediment fa una

anàlisi que permet distribuir els espermatozoides en diferents conglomerats o subpoblacions, de manera que cada espermatozoide pertany únicament i exclusiva a una subpoblació, i es basa en distàncies euclidianes computades en variables de motilitat, de manera que les cèl·lules espermàtiques que compartien característiques de motilitat s'assignaven a un mateix conglomerat o grup, mentre que les que diferien s'assignaven a conglomerats diferents. Aleshores, s'aplicaren diferents procediments: el procediment GLM per avaluar les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) i el procediment *Least Squares Means\** (LSMEANS) per determinar aquestes diferències. Ambdós procediments, el GLM i l'LSMEANS, també es van emprar per determinar les diferències estadístiques dels valors mitjans de la viabilitat, acrosomes alterats, anormalitats morfològiques i de motilitat entre els tractaments. Finalment, es va aplicar la  $\chi^2$  per determinar la distribució percentual de les subpoblacions de cada presa d'imatges; un cop determinada la distribució percentual de cada irradiació, es féu un test de Student/Neumann/Keuls per determinar i llistar, respectivament, les diferències entre les diverses irradiacions.

Conglomerat	Paràmetres	Conglomerat particular	Conglomerat més proper	Ràtio
1	VCL	0.76	0.63	0.63
	ALHmed	0.92	0.16	0.09
	ALHmax	0.87	0.14	0.15
	DNC	0.89	0.22	0.14
	DMM	0.36	0.17	0.77
	HHI	0.65	0.31	0.52
	HMX	0.53	0.35	0.72
2	LIN	0.96	0.22	0.06
	STR	0.62	0.14	0.45
	WOB	0.87	0.34	0.19
	AI	0.60	0.27	0.54
3	VSL	0.87	0.40	0.22
	VAP	0.96	0.35	0.07
	AV	0.87	0.44	0.23
	MADalg	0.11	0.05	0.94
	HBS	0.69	0.39	0.51
	HY	0.59	0.27	0.56
4	MADabs	0.78	0.38	0.36
	BCF	0.78	0.10	0.24
5	HLO	0.86	0.09	0.16
	HME	0.86	0.35	0.22

**Taula 9.** Relació dels resultats de l'aplicació del procediment VARCLUS per discriminar quines variables de la motilitat espermàtica, que proporcionava el programa CASA, donaven major informació.

Per a la segona i quarta sèries experimentals no calgué aplicar el procediment VARCLUS, ja que el nou programari (SCA2002<sup>®</sup>) donava els valors de menys

paràmetres. Els paràmetres de motilitat estudiats foren: VCL, VSL, STR, WOB, VAP, LIN, ALHmed, BCF i MT. Per a la SE2 s'analitzà la motilitat d'un total de 1479 espermatozoides i 4944 en la SE4.

A la SE5 les diferències entre els diferents grups (control, P7 i P50) s'analitzaren aplicant els procediments GLM i LSMEANS.

El criteri de significació es fixà en  $p < 0.05$ . Les dades es presenten en tot el treball com la mitjana  $\pm$  desviació estàndard (SD). Totes les dades que es mostren en les diferents taules corresponen a valors reals (sense normalitzar). La relació de nombre de mostres i animals que s'utilitzaren es mostra a la taula 5. En fer l'estadística, en arribar al número 7 de mostres, la  $p$  ja mostrava diferències estadístiques ( $p < 0.05$ ).

### **3.11. Detecció de proteïnes**

El control, juntament amb les mostres, tot just irradiades, es van congelar amb N<sub>2</sub> líquid a  $-196$  °C i es mantingueren posteriorment congelades a  $-80$  °C fins al moment de la seva anàlisi. Per a l'extracció de proteïnes, es centrifugaren les mostres de semen a 600 g durant 5 minuts, s'eliminà el sobrenedant i s'hi afegiren inhibidors de la fosfatasa per evitar la desfosforilació: 1  $\mu$ L a 100 mM de PMSF (inhibidor de serina-proteases) i 1  $\mu$ L a 100 mM de VO<sub>4</sub> (inhibidor de fosfatasas). Posteriorment, es centrifugaren les mostres a 600 g durant 2 minuts per eliminar el sobrenedant. S'afegí al pellet el tampó d'homogeneïtzació (per a la seva composició vegeu la taula 10) i es mantingué refredat en gel picat. Per aconseguir alliberar les proteïnes cal trencar les membranes cel·lulars, en aquest cas s'utilitzà un sonicador V50 Control IKA<sup>®</sup> LABORTECHNIK, per sonicar les mostres diverses vegades. Es deixaren reposar les mostres durant 15 minuts i es centrifugaren a 12000 g durant 30 minuts a 4 °C per separar els diferents components cel·lulars. La determinació de la concentració proteica del sobrenedant es quantificà mitjançant el mètode de Bradford (Bradford M, 1976).

El mètode de Bradford utilitza un colorant hidrofòbic, les dissolucions del qual, en presència d'àcid fosfòric, adquireixen un color bru i que en trobar-se en un entorn hidrofòbic, com el de l'interior d'una proteïna, es tornen d'un color blau intens fàcil de mesurar. Per determinar la concentració proteica total de les mostres, calgué realitzar una corba de calibratge prenent com a referència una recta patró que es va fer amb concentracions conegudes de proteïna, concretament d'albumina sèrica

bovina. Es prepararen les mostres problema, a les quals se'ls hi afegí el reactiu de Bradford i es va llegir l'absorbància\* a 595 nm en l'espectrofotòmetre, un SBP 2000 UV/ Vis Spectrophotometer (WPA).

- |                                 |
|---------------------------------|
| — Tris-HCl pH 7.4 50 mM: 200 µL |
| — EDTA 1 mM: 4 µL               |
| — EGTA 10mM: 40 µL              |
| — DTT 25 mM: 500 µL             |
| — Tritó-x100 1.5 %: 300 µL      |
| — PMSF 1 mM: 2 µL               |

**Taula 10.** Composició del tampó d'homogeneïtzació usat durant la sonicació de les mostres per a l'obtenció de proteïnes.

Un cop determinada l'equació de la recta patró s'interpolaren les absorbàncies obtingudes de les mostres problema sobre la recta representada per saber la quantitat de proteïnes presents en cada una de les mostres.

Un cop quantificada la concentració proteica de les mostres, es va procedir a la detecció de la fosfotirosina, mitjançant la tècnica de Western Blot, que permet la detecció de proteïnes específiques en mostres de proteïnes desnaturalitzades. De cada mostra a analitzar, es va carregar el volum corresponent a 10 µg de proteïna en gel d'acrilamida al 10 %, juntament amb un marcador de precisió de pes molecular com a control, que servia de patró de referència per a la identificació posterior de les diferents bandes proteiques que apareixeren en separar-se les diferents proteïnes per electroforesi. Posteriorment, es transferiren a una membrana de nitrocel·lulosa que, a la vegada, s'exposà a anticossos per a la detecció de les proteïnes interessades. En aquest estudi s'utilitzà com a anticòs primari l'antifosfotirosina PY20 de *Transduction Laboratories* a una dilució d'1:1000 i com a anticòs secundari un antiratolí (*antimouse*) a una dilució d'1:2000 i la reacció es va revelar amb un sistema de detecció ECL-Plus<sup>®</sup> (Amersham).

### **3.12. Observació de la formació d'espècies reactives de l'oxigen associades als mitocondris**

Per determinar les espècies reactives de l'oxigen d'origen mitocondrial (mROS) s'usà la cotinció amb colorant de detecció de ROS, la proxilfluorescamina i el colorant de la funcionalitat mitocondrial MitoTracker Red<sup>®</sup> CM-H<sub>2</sub>Xros (Wenzel i col·l., 2005) amb les modificacions descrites per Flores i col·l. (2009). La

col-localització de les imatges d'ambdues tincions indica les mROS en relació amb l'activitat mitocondrial de l'espermatozoide observat. Aquesta cotinció no permet separar els diversos tipus de ROS incloses en les mROS, sols fa una valoració global.

Per realitzar aquesta tècnica, s'incubaren alíquotes d'1 mL de les suspensions espermàtiques amb una solució de proxilfluorescamina, en una solució salina tamponada amb fostat (*Phosphate Buffered Saline*, PBS; pH 7.4) a una concentració final de 50  $\mu$ M. Els espermatozoides es mantingueren en incubació amb el colorant durant 10 minuts a 37 °C. Tot just després, les mostres es centrifugaren a 600 g durant 10 minuts a 20 °C i el pellet resultant en 1 mL d'una solució de Mitotracker Red<sup>®</sup> CMXRos, en PBS a una concentració final de 500 nM. Es deixaren reposar els espermatozoides 10 minuts a 37 °C i tot seguit es centrifugaren a 600 g durant 10 minuts a 20 °C; s'eliminà el sobrenedant i el sediment cel·lular es va resuspendre amb 50  $\mu$ L de PBS. Amb aquests espermatozoides rentats es feren extensions sobre portaobjectes de 76 mm x 26 mm i es deixaren assecar a l'aire. Un cop seques, les extensions es fixaren amb una solució de paraformaldehid al 2 % (w/v), en PBS durant 10 minuts a temperatura ambient. Transcorregut aquest temps, les extensions es rentaren bé amb banys successius d'aigua destil·lada i es tornaren a deixar assecar a l'aire. Tot el procés descrit es va realitzar en la foscor per evitar una estimulació precoç dels fluorocroms; igualment, les extensions es guardaren protegides de la llum, a 4 °C fins al moment de l'avaluació. Les mostres s'observaren en un microscopi confocal làser Leica TCS 4D (Leica Lasertechnik<sup>®</sup>; Heidelberg, Alemanya) adaptat a un microscopi invertit Leitz DMIRBE<sup>®</sup> i una lent Leitz Plan-Apo<sup>®</sup> (Leitz; Stuttgart, Alemanya) de 63 x (NA 1,4 oli). La font de llum fou un làser d'argó/críptó. La detecció de la fluorescència es dugué a terme després de l'excitació amb un làser de longitud d'ona de 543 nm i emissió a 440-480 nm per als mROS i d'emissió a 590-650 per al Mitotracker Red<sup>®</sup> CMXRos.

L'anàlisi del senyal d'intensitat, tant pel MitoTracker Red<sup>®</sup> com pel mROS, es realitzaren sobre les imatges digitalitzades captades pel microscopi confocal làser i emmagatzemades en format TIFF. Aquestes imatges es processaren mitjançant el programari d'imatges Adobe Photoshop<sup>®</sup>. A tal finalitat, mitjançant el comandament "selecció" del programa es seleccionaren les peces intermèdies dels espermatozoides continguts en la imatge, individualitzant-se cada peça intermèdia en una màscara individual. El nombre mínim d'espermatozoides que van ser



individualitzats d'aquesta manera va ser de 200 per punt experimental. Seguidament, s'analitzava la intensitat de tonalitats blava i vermella de cada una de les peces intermèdies individualitzades mitjançant els comandament "histograma" del programa, ajustat en primer lloc per a mesurar la intensitat del canal de tons blaus i en segon lloc per a mesurar la intensitat del canal de tons vermells. Aquesta eina donava un valor quantitatiu d'intensitat de color blau i vermell per a cada peça intermèdia, la qual cosa corresponia a la intensitat de tinció per a la proxilfluorescamina (blau) i el Mitotracker Red (vermell) de cada un dels espermatozoides analitzats. La quantificació sols es realitzà després d'una acurada homogeneïtzació de la brillantor i contrast pels canals de color blau i vermell dels fons que envoltaven a cada una de les peces intermèdies analitzades en cada imatge. Així, es donava el mateix valor d'intensitat de cadascun dels dos colors (valors arbitraris de 100 tant per al canal blau com per al canal vermell) a tots els fons entre els espermatozoides, la qual cosa va permetre fer una comparació directa dels valors d'intensitat de colors de cada una de les peces intermèdies analitzades entre si. Després d'això, es calculava els valors mitjans en format mitjanes de la intensitat de blaus i vermells de les peces intermèdies, prenent com a referència els valors adjudicats a las intensitats de color del fons de la imatge que, com s'ha mencionat abans, s'ajustaven a 100 en tots dos casos. D'aquesta manera, els valors d'intensitat de color blau i vermell de les peces intermèdies eren sempre valors d'intensitat per sobre del valor 100 atorgat a la intensitat de color del fons. Els valors de mitjanes  $\pm$  SEM així obtinguts en cada una de les imatges es comparaven després entre tractaments mitjançant l'anàlisi de varianza seguint el test de Student/Neumann/Keuls.

### **3.13. Prevenció de riscos**

L'ús de làsers, per les característiques pròpies de la seva radiació, obliguen a prendre una sèrie de mesures de seguretat que impliquen principalment la protecció ocular. Per això, en tot moment, es tingué present la Recomanació del Consell 1999/519/CE, de 12 de juliol de 1999, relativa a l'exposició del públic en general a camps electromagnètics (0 Hz a 300 GHz), així com els estàndards:

- UNE-EN 60825-1:1996 de seguretat dels productes làser.
- UNE-EN 60825-1/A2:2002 de seguretat dels productes làser.

Per a la protecció ocular, la irradiació de les mostres es féu dins d'una cambra fosca, de manera que no era possible que la irradiació pogués arribar a impactar sobre els ulls dels experimentadors.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DÍODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES

Marc-Ignasi Corral-Baqués

ISBN/ DL:T.1240-201

*Resposta de la motilitat espermàtica a la irradiació amb làser de díode de 655 nm d'emissió*



## RESULTATS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DÍODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES

Marc-Ignasi Corral-Baqués

ISBN/ DL:T.1240-201

*Resposta de la motilitat espermàtica a la irradiació amb làser de díode de 655 nm d'emissió*

## 4. RESULTATS

### 4.1. Sèrie experimental 1 (Dosi d'estimulació espermàtica)

Les mostres fresques ( $n = 8$  ejaculats, 2863 espermatozoides totals analitzats) presentaren la qualitat següent (mitjana  $\pm$  SD): viabilitat  $84.2 \pm 15.1$  %, acrosomes alterats  $15.1 \pm 8.9$  % i anomalies morfològiques  $11.0 \pm 4.0$  %.

El semen fresc caní no irradiat es va caracteritzar per una VCL de  $84.2 \pm 3.0 \mu\text{m s}^{-1}$ , VSL de  $47.3 \pm 3.2 \mu\text{m s}^{-1}$ , VAP de  $53.9 \pm 4.6 \mu\text{m s}^{-1}$ , una LIN de  $54.5 \pm 4.1$  %, STR de  $81.7 \pm 1.7$  %, WOB  $64.0 \pm 1.7$  %, ALHmed  $2.83 \pm 0.3 \mu\text{m}$ , DNC de  $293.4 \pm 44.1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ , BCF de  $14.0 \pm 0.9 \text{ Hz}$ , HLO de  $0.40 \pm 0.1 \mu\text{m}$ , MT del  $86.3 \pm 6.7$  % i una viabilitat mitjana del  $84.3 \pm 1.3$  %. Els resultats s'expressen en forma de mitjanes  $\pm$  SEM (taula 12).

#### 4.1.1. Efectes de les diferents dosis en la viabilitat de l'esperma de gos

La viabilitat de les mostres irradiades, als 15 minuts postirradiació, si es compara amb la mostra control no presentaren diferències significatives (taula 11).

Alíquota	Viabilitat (%)	Acrosomes (%)
<b>D0</b>	$80.8 \pm 1.1$	$9.9 \pm 1.7$
<b>D4</b>	$79.4 \pm 1.4$	$9.7 \pm 1.4$
<b>D6</b>	$74.9 \pm 0.8$	$12.7 \pm 0.2$
<b>D10</b>	$73.8 \pm 1.6$	$15.1 \pm 2.2$

**Taula 11.** Viabilitat de les mostres D0, D4, D6 i D10 irradiades, respectivament, amb 0, 4, 6 i 10  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  als 15 minuts postirradiació. Els resultats s'expressen en forma de mitjanes  $\pm$  SEM.

#### 4.1.2. Efectes de les diferents dosis en les característiques de motilitat de l'esperma de gos

S'observaren tant canvis en funció de la dosi com del temps (taula 12). Els resultats obtinguts foren els següents:

##### i. Canvis tot just després de la irradiació

Cap de les alíquotes mostrà cap canvi estadísticament significatiu ( $p < 0.05$ ) respecte de D0 al temps 0 (taula 12).

	t	D0	D4	D6	D10
<b>VAP</b> ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )	<b>0</b>	$53.9 \pm 4.6^a$	$53.9 \pm 4.6^a$	$53.9 \pm 4.6^a$	$53.9 \pm 4.6^a$
	<b>00</b>	$53.9 \pm 4.6^a$	$46.6 \pm 4.6^a$	$53.2 \pm 4.6^a$	$52.5 \pm 4.6^a$
	<b>15</b>	$30.4 \pm 4.6^b$	$45.1 \pm 4.6^a$	$44.3 \pm 4.3^a$	$43.5 \pm 4.6^a$
	<b>45</b>	$19.8 \pm 4.9^b$	$40.3 \pm 4.9^a$	$35.1 \pm 4.9^a$	$39.7 \pm 4.9^a$
<b>LIN</b> (%)	<b>0</b>	$54.5 \pm 4.1^a$	$54.5 \pm 4.1^a$	$54.5 \pm 4.1^a$	$54.5 \pm 4.1^a$
	<b>00</b>	$54.5 \pm 4.1^a$	$50.0 \pm 4.1^a$	$52.0 \pm 4.1^a$	$53.0 \pm 4.1^a$
	<b>15</b>	$31.2 \pm 4.1^b$	$48.5 \pm 4.1^a$	$48.9 \pm 4.1^a$	$46.8 \pm 4.1^a$
	<b>45</b>	$20.8 \pm 4.4^b$	$42.6 \pm 4.4^a$	$47.7 \pm 4.4^a$	$50.4 \pm 4.4^a$
<b>ALHmed</b> ( $\mu\text{m}$ )	<b>0</b>	$2.83 \pm 0.3^a$	$2.83 \pm 0.3^a$	$2.83 \pm 0.3^a$	$2.83 \pm 0.3^a$
	<b>00</b>	$2.83 \pm 0.3^a$	$2.80 \pm 0.3^a$	$3.12 \pm 0.3^a$	$3.06 \pm 0.3^a$
	<b>15</b>	$1.99 \pm 0.3^a$	$2.84 \pm 0.3^a$	$2.80 \pm 0.3^a$	$2.87 \pm 0.3^a$
	<b>45</b>	$1.54 \pm 0.3^a$	$2.87 \pm 0.3^a$	$2.55 \pm 0.3^a$	$2.8 \pm 0.3^a$
<b>DNC</b> ( $\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )	<b>0</b>	$293.4 \pm 44.1^a$	$293.4 \pm 44.1^a$	$293.4 \pm 44.1^a$	$293.4 \pm 44.1^a$
	<b>00</b>	$293.4 \pm 44.1^a$	$267.3 \pm 44.1^a$	$322.3 \pm 44.1^a$	$333.7 \pm 44.1^a$
	<b>15</b>	$198.4 \pm 44.1^a$	$274.1 \pm 44.1^a$	$252.6 \pm 44.1^a$	$282.5 \pm 44.1^a$
	<b>45</b>	$140.5 \pm 47.1^a$	$286.4 \pm 47.1^a$	$216.1 \pm 47.1^a$	$242.1 \pm 47.1^a$
<b>BCF</b> (Hz)	<b>0</b>	$14.0 \pm 0.9^a$	$14.0 \pm 0.9^a$	$14.0 \pm 0.9^a$	$14.0 \pm 0.9^a$
	<b>00</b>	$14.0 \pm 0.9^a$	$15.0 \pm 0.9^a$	$14.6 \pm 0.9^a$	$15.8 \pm 0.9^a$
	<b>15</b>	$10.4 \pm 0.9^a$	$15.0 \pm 0.9^a$	$14.8 \pm 0.9^a$	$14.9 \pm 0.9^a$
	<b>45</b>	$8.21 \pm 0.9^b$	$15.9 \pm 0.9^a$	$15.7 \pm 0.9^a$	$14.1 \pm 0.9^a$
<b>HLO</b> ( $\mu\text{m}$ )	<b>0</b>	$0.40 \pm 0.1^a$	$0.40 \pm 0.1^a$	$0.40 \pm 0.1^a$	$0.40 \pm 0.1^a$
	<b>00</b>	$0.40 \pm 0.1^a$	$0.38 \pm 0.1^a$	$0.51 \pm 0.1^a$	$0.52 \pm 0.1^a$
	<b>15</b>	$0.17 \pm 0.1^a$	$0.41 \pm 0.1^a$	$0.44 \pm 0.1^a$	$0.42 \pm 0.1^a$
	<b>45</b>	$0.13 \pm 0.1^a$	$0.33 \pm 0.1^a$	$0.26 \pm 0.1^a$	$0.33 \pm 0.1^a$
<b>MT</b> (%)	<b>0</b>	$86.2 \pm 6.7^a$	$86.2 \pm 6.7^a$	$86.2 \pm 6.7^a$	$86.2 \pm 6.7^a$
	<b>00</b>	$86.2 \pm 6.7^a$	$76.9 \pm 6.7^a$	$87.6 \pm 6.7^a$	$79.5 \pm 6.7^a$
	<b>15</b>	$83.4 \pm 6.7^a$	$80.7 \pm 6.7^a$	$90.4 \pm 6.7^a$	$78.4 \pm 6.7^a$
	<b>45</b>	$77.3 \pm 7.1^a$	$67.4 \pm 7.1^a$	$75.6 \pm 7.1^a$	$67.8 \pm 7.1^a$

**Taula 12.** Evolució dels diferents paràmetres de motilitat al llarg del temps (t) depenent de la dosi (D0 = control, D4 =  $4 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ , D6 =  $6 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  i D10 =  $10 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Cada paràmetre forma un grup independent amb cada dosi. Cada grup independent està constituït per quatre mesures diferents (0 = abans de la irradiació, 00 = tot just després d'irradiar, 15 = 15 minuts després de la irradiació i 45 = 45 minuts després d'irradiar, on 0 i 00 en el control corresponen al mateix temps). Valors amb la mateixa lletra com a superíndex no són significativament diferents entre ells, mentre que els que tenen lletra diferent si que ho són ( $p < 0.05$ ). Els resultats s'expressen en forma de mitjanes  $\pm$  SEM.

## ii. Canvis als 15 minuts posteriors a la irradiació

En D0 tant la VAP com la LIN disminüïren significativament ( $p < 0.05$ ), si es compara amb el temps 0 (taula 12).

Les mostres irradiades: D4, D6 i D10 no mostraren canvis respecte de D0 (taula 12).

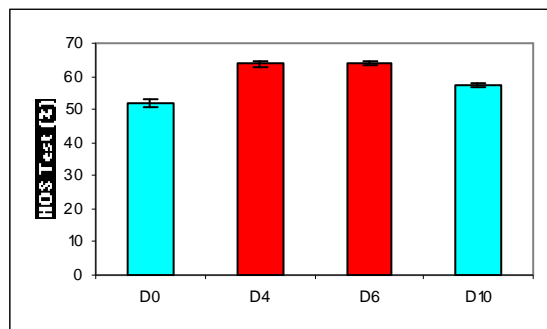
## iii. Canvis als 45 minuts posteriors a la irradiació

En D0 la VAP, LIN i BCF disminüïren significativament ( $p < 0.05$ ), si es compara amb el temps 0, però no pas respecte del temps 15 minuts (taula 12).

Les mostres irradiades D4, D6 i D10 no mostraren canvis respecte de D0 ni respecte del temps 15 minuts, és a dir, mantingueren les característiques mòtils inicials de l'ejaculat als 45 minuts (taula 12).

### 4.1.3. Proves metabòliques

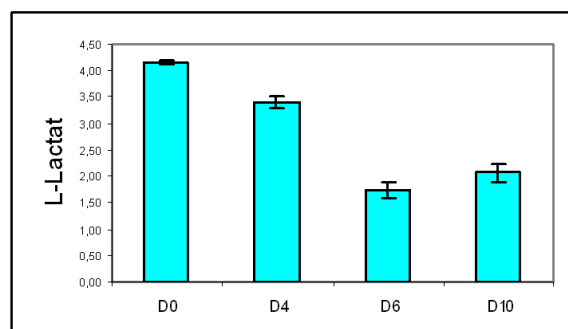
**EI HOST:** mostrà canvis estadísticament significatius ( $p < 0.05$ ) respecte de D0 i els irradiats amb  $10 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ , amb els grups irradiats amb 4 i  $6 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  (gràfic 1).



**Gràfic 1.** Evolució entre el HOST i la dosi aplicada (D0 = control, D4 =  $4 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ , D6 =  $6 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  i D10 =  $10 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). S'han remarcat de color vermell les columnes que presenten diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) respecte de D0. Els resultats s'expressen en forma de mitjanes  $\pm$  SEM de 8 experiments diferents.

**Test del L-lactat:** s'observà una tendència a una menor producció de L-lactat en els grups irradiats respecte del control (gràfic 2).





**Gràfic 2.** Producció de L-lactat en funció de la dosi aplicada (D0 = control, D4 = 4 J·cm<sup>-2</sup>, D6 = 6 J·cm<sup>-2</sup> i D10 = 10 J·cm<sup>-2</sup>). Els resultats s'expressen en forma de mitjanes ± SEM. No s'observaren diferències significatives.

#### 4.2. Sèrie experimental 2 (Rang d'afectació espermàtica per làser)

La qualitat inicial de les mostres fresques (n = 8 ejaculats, 1479 espermatozoides totals analitzats) fou la següent (mitjana ± SD): viabilitat 80.7 ± 9.8 %, acrosomes alterats 12.3 ± 5.5 % i anomalies morfològiques 16.1 ± 11.1 %.

L'esperma fresc de gos es va caracteritzar per una VCL de 146.5 ± 1.7 μm s<sup>-1</sup>, VSL de 80.4 ± 1.3 μm s<sup>-1</sup>, VAP de 92.5 ± 1.2 μm s<sup>-1</sup>, LIN de 54.4 ± 1.0 %, STR 77.7 ± 1.0 %, WOB de 59.2 ± 0.9 %, ALHmed 5.9 ± 0.1 μm, BCF de 10.1 ± 0.3 Hz, una MT del 89.1 ± 6.7 % i una viabilitat mitjana de 82.05 ± 0.6 %. Els resultats s'expressen en forma de mitjanes ± SEM (taula 15).

L'anàlisi de l'estructura de subpoblacions mòtils, basada en les característiques de la motilitat espermàtica (taula 13), va mostrar l'existència de 4 subpoblacions (Sbp), aquestes mostraren les característiques següents:

**Sbp 1.** Representava el 29.3 % de la totalitat de la població espermàtica (taula 24) i es definí per tenir la menor VSL (40.8 ± 2.6 μm s<sup>-1</sup>) i la segona LIN (55.8 ± 2.1 %) més baixa (taula 13).

**Sbp 2.** Es determinà per tenir la segona VSL més baixa (70.8 ± 2.9 μm s<sup>-1</sup>), juntament amb la LIN més baixa (37.1 ± 2.3 %) (taula 13) i representa el 17.5 % del total de la població espermàtica (taula 24).

**Sbp 3.** Mostrà una VSL i LIN més ràpides (82.5 ± 2.4 μm s<sup>-1</sup> i 59.2 ± 1.9 %, respectivament) (taula 13) i va representar el 28.4 % de la totalitat de la població espermàtica (taula 24).

**Sbp 4.** Definida per la VSL i LIN més altes de  $127.6 \pm 2.6 \mu\text{m s}^{-1}$  i  $65.5 \pm 2.0 \%$ , respectivament (taula 13), i representà el 24.8 % de la població espermàtica total (taula 24).

Paràmetres de motilitat espermàtica	Sbp 1	Sbp 2	Sbp 3	Sbp 4
VCL ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )	$55.8 \pm 3.3$	$192.0 \pm 3.8$	$140.7 \pm 3.1$	$197.5 \pm 3.4$
VSL ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )	$40.8 \pm 2.6$	$70.8 \pm 2.9$	$82.5 \pm 2.4$	$127.6 \pm 2.6$
VAP ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )	$36.2 \pm 2.4$	$101.6 \pm 2.7$	$92.9 \pm 2.3$	$139.1 \pm 2.4$
LIN (%)	$55.8 \pm 2.0$	$37.1 \pm 2.3$	$59.2 \pm 1.9$	$65.5 \pm 2.0$
STR (%)	$60.7 \pm 2.1$	$71.6 \pm 2.3$	$86.6 \pm 1.9$	$91.8 \pm 2.1$
WOB (%)	$46.4 \pm 1.8$	$53.3 \pm 2.1$	$65.8 \pm 1.7$	$71.2 \pm 1.8$
ALHmed( $\mu\text{m}$ )	$4.51 \pm 0.2$	$7.8 \pm 0.3$	$5.04 \pm 0.2$	$6.2 \pm 0.2$
BCF (Hz)	$7.17 \pm 0.5$	$9.6 \pm 0.6$	$11.1 \pm 0.5$	$12.3 \pm 0.5$

Taula 13. Mitjana dels valors de la motilitat de les subpoblacions (Sbp) d'esperma fresc. Els resultats s'expressen en forma de mitjanes  $\pm$  SEM.

#### 4.2.1. Efectes de les diferents dosis en la viabilitat de l'esperma de gos

La viabilitat de les mostres irradiades (taula 14), als 15 minuts postirradiació, si es compara amb la mostra control no presentaren diferències significatives.

Alíquota	Viabilitat (%)	Acrosomes (%)
D0	$75.4 \pm 0.6$	$14.6 \pm 2.1$
D2	$74.7 \pm 0.6$	$14.5 \pm 2.1$
D12	$72.7 \pm 0.8$	$19.1 \pm 2.7$
D16	$69.0 \pm 0.8$	$17.8 \pm 2.5$

Taula 14. Viabilitat de les mostres D0, D2, D12 i D16 irradiades, respectivament, amb 0, 2, 12 i 16 J·cm<sup>-2</sup> als 15 minuts postirradiació. Els resultats s'expressen en forma de mitjanes  $\pm$  SEM.

#### 4.2.2. Efectes de les diferents dosis en les característiques de motilitat de l'esperma de gos

Els resultats observats mostraren canvis, tant en funció de la dosi com del temps. Els resultats obtinguts foren els següents (taula 15):

##### i. Canvis tot just després de la irradiació

Immediatament després de la irradiació les diferents dosis, control (D0), 2 J·cm<sup>-2</sup> (D2), 12 J·cm<sup>-2</sup> (D12) i 16 J·cm<sup>-2</sup> (D16), mostraren comportaments diferents (taula 15).

**D2.** La menor energia irradiada va disminuir significativament ( $p < 0.05$ ) els valors de la VCL, VAP i ALHmed, mentre que varen augmentar, també significativament, la VSL i WOB si es compara amb D0 (taula 15).

	t	0	D2	D12	D16
<b>VCL</b> ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )	0	146.5 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	146.5 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	146.5 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	146.5 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
	00	146.5 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	126.9 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	154.0 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	140.1 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>
	45	167.2 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>	125.7 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	147.4 $\pm$ 1.8 <sup>ab</sup>	183.9 $\pm$ 5.9 <sup>b</sup>
<b>VSL</b> ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )	0	80.4 $\pm$ 1.3	80.4 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	80.4 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	80.4 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>
	00	80.4 $\pm$ 1.3	96.8 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	80.2 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	63.4 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>
	45	83.7 $\pm$ 1.5	64.2 $\pm$ 1.4 <sup>c</sup>	64.8 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	111.3 $\pm$ 4.6 <sup>c</sup>
<b>VAP</b> ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )	0	92.5 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	92.5 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	92.5 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	92.5 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>
	00	92.5 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	84.2 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	98.8 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	88.6 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>
	45	102.1 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	80.5 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	88.8 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	130.2 $\pm$ 4.3 <sup>b</sup>
<b>LIN</b> (%)	0	54.4 $\pm$ 1.0	54.4 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	54.4 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	54.4 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>
	00	54.4 $\pm$ 1.0	50.6 $\pm$ 0.9 <sup>ab</sup>	52.1 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	45.0 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>
	45	50.3 $\pm$ 1.2	49.8 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	44.8 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	57.4 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>
<b>STR</b> (%)	0	77.7 $\pm$ 1.1	77.7 $\pm$ 1.1	77.7 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	77.7 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>
	00	77.7 $\pm$ 1.1	76.3 $\pm$ 0.9	78.8 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	69.4 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>
	45	81.1 $\pm$ 1.2	75.6 $\pm$ 1.1	72.0 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	81.2 $\pm$ 3.7 <sup>a</sup>
<b>WOB</b> (%)	0	59.2 $\pm$ 0.9	59.2 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	59.2 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	59.2 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>
	00	59.2 $\pm$ 0.9	64.6 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	65.2 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	64.2 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>
	45	61.2 $\pm$ 1.1	65.3 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	61.6 $\pm$ 1.0 <sup>ab</sup>	69.1 $\pm$ 3.2 <sup>ab</sup>
<b>ALHmed</b> ( $\mu\text{m}$ )	0	5.9 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	5.88 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	5.88 $\pm$ 0.1	5.88 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
	00	5.9 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	4.70 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	5.75 $\pm$ 0.1	5.24 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
	45	6.6 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	4.82 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	5.9 $\pm$ 0.1	5.90 $\pm$ 0.4 <sup>ab</sup>
<b>BCF</b> (Hz)	0	10.1 $\pm$ 0.3	10.1 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	10.1 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	10.1 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
	00	10.1 $\pm$ 0.3	9.08 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>	9.98 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	8.94 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>
	45	9.2 $\pm$ 0.3	8.37 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	8.35 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	8.93 $\pm$ 0.9 <sup>ab</sup>
<b>MT</b> (%)	0	89.1 $\pm$ 2.0	89.1 $\pm$ 2.0	89.1 $\pm$ 2.0	89.1 $\pm$ 2.0
	00	89.1 $\pm$ 2.0	90.8 $\pm$ 2.3	84.4 $\pm$ 3.5	88.9 $\pm$ 2.3
	45	78.0 $\pm$ 7.7	74.2 $\pm$ 7.4	68 $\pm$ 7.8	79.7 $\pm$ 6.0

**Taula 15.** Evolució dels diferents paràmetres de motilitat al llarg del temps (t) en funció de la dosi irradiada (D0 = control, D2 = 2 J·cm<sup>-2</sup>, D12 = 12 J·cm<sup>-2</sup> i D16 = 16 J·cm<sup>-2</sup>). Cada paràmetre forma un grup independent amb cada dosi. Cada grup independent està constituït per tres mesures diferents (0 = abans de la irradiació, 00 = tot just després d'irradiar i 45 = 45 minuts després d'irradiar, on 0 i 00 en el control corresponen al mateix temps). Valors amb la mateixa lletra com a superíndex no són significativament diferents entre ells, mentre que els que tenen lletra diferent si que ho són ( $p < 0.05$ ). Els resultats s'expressen en forma de mitjanes  $\pm$  SEM.

**D12.** La segona dosi augmentà significativament ( $p < 0.05$ ), si es compara amb D0, els valors de la VCL, VAP i WOB (taula 15).

**D16.** La dosi més alta va fer disminuir significativament ( $p < 0.05$ ), si es compara amb D0, els valors de la VSL, LIN, STR, ALHmed i BCF, mentre que els valors de la WOB augmentaren significativament (taula 15).

## **ii. Canvis als 45 minuts posteriors a la irradiació**

Diversos paràmetres de la motilitat espermàtica es veieren afectats de diferent manera, segons la dosi irradiada, als 45 minuts postirradiació (taula 15).

**D0.** La VCL, VAP i ALHmed augmentaren significativament ( $p < 0.05$ ), si es compara amb el temps 0 (taula 15).

**D2.** Va fer disminuir significativament ( $p < 0.05$ ) respecte a D0 al temps 0 la VCL, VSL, VAP, LIN, ALHmed i BCF, mentre que la WOB augmentà significativament ( $p < 0.05$ ) (taula 15).

**D12.** Va disminuir significativament ( $p < 0.05$ ) respecte a D0 al temps 0 la VSL, LIN, STR i BCF (taula 15).

**D16.** Va fer augmentar significativament ( $p < 0.05$ ) respecte a D0 al temps 0 la VCL i la VAP, mentre que la VSL va disminuir (taula 15).

### **4.2.3. Efectes de les diferents dosis en les subpoblacions de l'esperma de gos**

També en aquest cas, la irradiació de l'esperma caní, a diferents dosis, a una mateixa potència d'emissió de sortida, va donar lloc a diferents efectes, tant en funció de la dosi com del temps transcorregut després de la irradiació (taules de la 16 a la 23).

#### **i. Canvis just després de la irradiació**

**D2.** La dosi més baixa afectà significativament ( $p < 0.05$ ) la Sbp 1, disminuint els valors de la VSL, VAP, LIN i ALHmed, augmentà significativament ( $p < 0.05$ ) el valor

de la WOB; la Sbp 3, disminuint significativament ( $p < 0.05$ ) els valors de la VCL, VSL, VAP, LIN, STR i BCF; la Sbp 2 va veure afectades de forma significativa ( $p < 0.05$ ) la VSL, LIN, STR i WOB augmentant els seus valors i disminuint els de la VCL i l'ALHmed. Cap dels paràmetres de la Sbp 4 es veieren afectats (taules de la 16 a la 23).

**D12.** Sols afectà significativament ( $p < 0.05$ ) paràmetres de la Sbp 1 augmentant significativament ( $p < 0.05$ ) la VCL, VAP i WOB (taules de la 16 a la 23).

**D16.** La dosi més alta afectà totes les Sbp llevat de la Sbp 3. De la Sbp 1 s'afectaren significativament ( $p < 0.05$ ) els valors de la VSL, LIN i ALHmed disminuint-los i augmentant els valors de la WOB; la Sbp 2 va veure disminuir significativament ( $p < 0.05$ ) els valors de la VCL, VSL, LIN, STR, ALHmed i BCF; així mateix, a la Sbp 4 també disminuïren significativament ( $p < 0.05$ ) els valors de la VSL i la VAP (taules de la 16 a la 23).

## ii. Canvis als 45 minuts posteriors a la irradiació

**D0.** Als 45 minuts augmentaren significativament ( $p < 0.05$ ) els valors de la VCL, VAP i STR de la Sbp 1, la VAP de la Sbp 2 i l'ALHmed de la Sbp 3 (taules de la 16 a la 23).

**D2.** La dosi més baixa afectà totes les Sbp llevat de la Sbp 4; en la Sbp 1 augmentà significativament ( $p < 0.05$ ) la WOB; a la Sbp 2 augmentaren significativament ( $p < 0.05$ ) els valors de la LIN, STR i WOB, i disminuïren els de la VAP i l'ALHmed, mentre que la VSL i l'ALHmed disminuïren significativament; en la Sbp 3 els valors que variaren significativament foren la VCL, VSL, VAP, LIN, STR i BCF, tots aquests disminuïren (taules de la 16 a la 23).

**D12.** Afectà totes les subpoblacions llevat de la Sbp 3, a la Sbp 1 augmentaren els seus valors significativament ( $p < 0.05$ ) la VCL, VAP i WOB. A la Sbp 2 disminuïren els seus valors significativament la VSL, LIN i STR, i també disminuïren els seus valors en la Sbp 4 la VSL, VAP i BCF (taules de la 16 a la 23).

Sbp \ VCL	t	D0	D2	D12	D16
1	0	55.8 ± 3.3 <sup>a</sup>	55.8 ± 3.3	55.8 ± 3.3 <sup>a</sup>	55.8 ± 3.3 <sup>a</sup>
	00	55.8 ± 3.3 <sup>a</sup>	37.7 ± 3.5	91.5 ± 4.3 <sup>b</sup>	56.3 ± 3.5 <sup>a</sup>
	45	108.8 ± 5.4 <sup>b</sup>	38.9 ± 3.7	84.4 ± 3.6 <sup>b</sup>	123.7 ± 3.4 <sup>b</sup>
2	0	192.0 ± 3.8	192.0 ± 3.8 <sup>a</sup>	192.0 ± 3.8	192.0 ± 3.8 <sup>a</sup>
	00	192.0 ± 3.8	161.7 ± 2.5 <sup>b</sup>	183.8 ± 2.9	162.5 ± 3.6 <sup>b</sup>
	45	209.7 ± 3.5	143.0 ± 3.0 <sup>c</sup>	177.9 ± 4.7	190.2 ± 2.8 <sup>a</sup>
3	0	140.7 ± 3.1	140.7 ± 3.1 <sup>a</sup>	140.7 ± 3.1	140.7 ± 3.1 <sup>a</sup>
	00	140.7 ± 3.1	117.6 ± 2.7 <sup>b</sup>	138.1 ± 2.9	143.6 ± 2.7 <sup>a</sup>
	45	152.49 ± 2.78	120.9 ± 3.6 <sup>b</sup>	140.4 ± 3.0	176.6 ± 4.1 <sup>b</sup>
4	0	197.5 ± 3.4	197.5 ± 3.4	197.5 ± 3.4	197.5 ± 3.4
	00	197.5 ± 3.4	190.6 ± 3.2	202.5 ± 3.4	198.1 ± 2.6
	45	197.9 ± 3.5	199.8 ± 3.5	186.8 ± 2.6	244.9 ± 22.9

**Taula 16.** Variació de la VCL ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) en cada subpoblació al llarg del temps (t) en funció de la dosi irradiada (D0 = control, D2 = 2 J·cm<sup>-2</sup>, D12 = 12 J·cm<sup>-2</sup> i D16 = 16 J·cm<sup>-2</sup>). Cada Sbp forma un grup independent amb cada potència. Cada grup independent està constituït per tres mesures diferents (0 = abans de la irradiació, 00 = tot just després d'irradiar, 45 = 45 minuts després d'irradiar, on 0 i 00 en el control corresponen al mateix temps). Valors amb la mateixa lletra com a superíndex no són significativament diferents entre ells, mentre que els que tenen lletra diferent si que ho són ( $p < 0.05$ ). Els resultats s'expressen en forma de mitjanes ± SEM.

Sbp \ VSL	t	D0	D2	D12	D16
1	0	40.8 ± 2.6	40.8 ± 2.6 <sup>a</sup>	40.8 ± 2.6	40.8 ± 2.6 <sup>a</sup>
	00	40.8 ± 2.6	13.1 ± 2.8 <sup>b</sup>	37.8 ± 3.3	22.5 ± 2.8 <sup>b</sup>
	45	48.2 ± 4.2	18.9 ± 2.9 <sup>b</sup>	36.6 ± 2.8	64.7 ± 2.6 <sup>c</sup>
2	0	70.8 ± 2.9	70.8 ± 2.9 <sup>a</sup>	70.8 ± 2.9 <sup>a</sup>	70.8 ± 2.9 <sup>a</sup>
	00	70.8 ± 2.9	87.9 ± 2.0 <sup>b</sup>	70.3 ± 2.3 <sup>a</sup>	39.8 ± 2.8 <sup>b</sup>
	45	79.8 ± 2.7	82.2 ± 2.3 <sup>ab</sup>	42.7 ± 3.7 <sup>b</sup>	110.4 ± 2.2 <sup>c</sup>
3	0	82.5 ± 2.4	82.5 ± 2.4 <sup>a</sup>	82.5 ± 2.4	82.5 ± 2.4 <sup>a</sup>
	00	82.5 ± 2.4	52.9 ± 2.1 <sup>b</sup>	86.0 ± 2.2	78.0 ± 2.1 <sup>a</sup>
	45	80.1 ± 2.2	41.1 ± 2.8 <sup>b</sup>	76.4 ± 2.3	54.3 ± 3.2 <sup>b</sup>
4	0	127.6 ± 2.6	127.6 ± 2.6	127.6 ± 2.6 <sup>a</sup>	127.6 ± 2.6 <sup>a</sup>
	00	127.6 ± 2.6	125.1 ± 2.5	126.5 ± 2.7 <sup>a</sup>	113.2 ± 2.0 <sup>b</sup>
	45	126.7 ± 2.7	114.4 ± 2.8	103.4 ± 2.0 <sup>b</sup>	215.6 ± 17.9 <sup>c</sup>

**Taula 17.** Variació de la VSL ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) en cada subpoblació al llarg del temps (t) en funció de la dosi irradiada (D0 = control, D2 = 2 J·cm<sup>-2</sup>, D12 = 12 J·cm<sup>-2</sup> i D16 = 16 J·cm<sup>-2</sup>). Cada Sbp forma un grup independent amb cada potència. Cada grup independent està constituït per tres mesures diferents (0 = abans de la irradiació, 00 = tot just després d'irradiar, 45 = 45 minuts després d'irradiar, on 0 i 00 en el control corresponen al mateix temps). Valors amb la mateixa lletra com a superíndex no són significativament diferents entre ells, mentre que els que tenen lletra diferent si que ho són ( $p < 0.05$ ). Els resultats s'expressen en forma de mitjanes ± SEM.

Sbp \ VAP	t	D0	D2	D12	D16
1	0	36.2 ± 2.4 <sup>a</sup>	36.2 ± 2.4 <sup>a</sup>	36.2 ± 2.4 <sup>a</sup>	36.2 ± 2.4 <sup>a</sup>
	00	36.2 ± 2.4 <sup>a</sup>	21.8 ± 2.5 <sup>b</sup>	58.4 ± 3.1 <sup>b</sup>	36.3 ± 2.6 <sup>a</sup>
	45	60.2 ± 3.9 <sup>b</sup>	26.6 ± 2.7 <sup>a</sup>	53.9 ± 2.6 <sup>b</sup>	78.4 ± 2.4 <sup>b</sup>
2	0	101.6 ± 2.7 <sup>a</sup>	101.6 ± 2.7 <sup>ab</sup>	101.6 ± 2.7	101.6 ± 2.7 <sup>a</sup>
	00	101.6 ± 2.7 <sup>a</sup>	106.6 ± 1.8 <sup>a</sup>	102.3 ± 2.1	99.6 ± 2.6 <sup>a</sup>
	45	115.8 ± 2.5 <sup>b</sup>	94.0 ± 2.1 <sup>b</sup>	93.8 ± 3.4	124.7 ± 2.0 <sup>b</sup>
3	0	92.9 ± 2.3	92.9 ± 2.3 <sup>a</sup>	92.9 ± 2.3	92.9 ± 2.3
	00	92.9 ± 2.3	71.7 ± 2.0 <sup>b</sup>	95.5 ± 2.1	91.6 ± 1.9
	45	94.1 ± 2.0	72.2 ± 2.6 <sup>b</sup>	89.1 ± 2.1	99.9 ± 2.9
4	0	139.1 ± 2.4	139.1 ± 2.4	139.1 ± 2.4 <sup>a</sup>	139.1 ± 2.4 <sup>a</sup>
	00	139.1 ± 2.4	136.7 ± 2.3	138.9 ± 2.5 <sup>a</sup>	127.0 ± 1.9 <sup>b</sup>
	45	138.4 ± 2.5	129.1 ± 2.6	118.5 ± 1.9 <sup>b</sup>	217.8 ± 16.5 <sup>c</sup>

**Taula 18.** Variació de la VAP ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) en cada subpoblació al llarg del temps (t) en funció de la dosi irradiada (D0 = control, D2 = 2 J·cm<sup>-2</sup>, D12 = 12 J·cm<sup>-2</sup> i D16 = 16 J·cm<sup>-2</sup>). Cada Sbp forma un grup independent amb cada potència. Cada grup independent està constituït per tres mesures diferents (0 = abans de la irradiació, 00 = tot just després d'irradiar, 45 = 45 minuts després d'irradiar, on 0 i 00 en el control corresponen al mateix temps). Valors amb la mateixa lletra com a superíndex no són significativament diferents entre ells, mentre que els que tenen lletra diferent si que ho són ( $p < 0.05$ ). Els resultats s'expressen en forma de mitjanes ± SEM.

Sbp \ LIN	t	D0	D2	D12	D16
1	0	55.8 ± 2.0	55.8 ± 2.0 <sup>a</sup>	55.8 ± 2.0 <sup>a</sup>	55.8 ± 2.0 <sup>a</sup>
	00	55.8 ± 2.0	33.6 ± 2.1 <sup>b</sup>	44.0 ± 2.6 <sup>ab</sup>	42.5 ± 2.1 <sup>b</sup>
	45	45.6 ± 3.3	46.8 ± 2.2 <sup>a</sup>	44.3 ± 2.2 <sup>b</sup>	52.4 ± 2.0 <sup>ab</sup>
2	0	37.1 ± 2.3	37.1 ± 2.3 <sup>a</sup>	37.1 ± 2.3 <sup>ab</sup>	37.1 ± 2.3 <sup>a</sup>
	00	37.1 ± 2.3	55.8 ± 1.5 <sup>b</sup>	38.3 ± 1.7 <sup>a</sup>	24.4 ± 2.2 <sup>b</sup>
	45	37.9 ± 2.1	58.8 ± 1.8 <sup>b</sup>	24.1 ± 2.8 <sup>b</sup>	58.9 ± 1.7 <sup>c</sup>
3	0	59.2 ± 1.9	59.2 ± 1.9 <sup>a</sup>	59.2 ± 1.9	59.2 ± 1.9 <sup>a</sup>
	00	59.2 ± 1.9	46.6 ± 1.6 <sup>b</sup>	62.7 ± 1.7	55.1 ± 1.6 <sup>a</sup>
	45	53.4 ± 1.7	35.6 ± 2.2 <sup>c</sup>	55.0 ± 1.8	30.7 ± 2.4 <sup>b</sup>
4	0	65.5 ± 2.0	65.5 ± 2.0	65.5 ± 2.0	65.5 ± 2.0
	00	65.5 ± 2.0	66.5 ± 1.9	63.3 ± 2.1	57.9 ± 1.6
	45	64.1 ± 2.1	58.2 ± 2.1	55.8 ± 1.6	88.0 ± 13.8

**Taula 19.** Variació de la LIN (%) en cada subpoblació al llarg del temps (t) en funció de la dosi irradiada (D0 = control, D2 = 2 J·cm<sup>-2</sup>, D12 = 12 J·cm<sup>-2</sup> i D16 = 16 J·cm<sup>-2</sup>). Cada Sbp forma un grup independent amb cada potència. Cada grup independent està constituït per tres mesures diferents (0 = abans de la irradiació, 00 = tot just després d'irradiar, 45 = 45 minuts després d'irradiar, on 0 i 00 en el control corresponen al mateix temps). Valors amb la mateixa lletra com a superíndex no són significativament diferents entre ells, mentre que els que tenen lletra diferent si que ho són ( $p < 0.05$ ). Els resultats s'expressen en forma de mitjanes ± SEM.

Sbp \ STR	t	D0	D2	D12	D16
1	0	60.7 ± 2.1 <sup>a</sup>	60.7 ± 2.1	60.7 ± 2.1	60.7 ± 2.1 <sup>a</sup>
	00	60.7 ± 2.1 <sup>a</sup>	56.7 ± 2.2	64.9 ± 02.6	62.9 ± 2.2 <sup>a</sup>
	45	78.0 ± 3.3 <sup>b</sup>	67.8 ± 2.3	68.1 ± 2.2	81.9 ± 2.1 <sup>b</sup>
2	0	71.6 ± 2.3	71.6 ± 2.3 <sup>a</sup>	71.6 ± 2.3 <sup>a</sup>	71.6 ± 2.3 <sup>a</sup>
	00	71.6 ± 2.3	82.7 ± 1.6 <sup>b</sup>	69.0 ± 1.8 <sup>a</sup>	40.5 ± 2.2 <sup>b</sup>
	45	69.9 ± 2.1	87.5 ± 1.8 <sup>b</sup>	47.2 ± 2.9 <sup>b</sup>	88.5 ± 1.7 <sup>c</sup>
3	0	86.6 ± 1.9	86.6 ± 1.9 <sup>a</sup>	86.6 ± 1.9	86.6 ± 1.9 <sup>a</sup>
	00	86.6 ± 1.9	74.3 ± 1.7 <sup>b</sup>	90.1 ± 1.8	85.1 ± 1.7 <sup>a</sup>
	45	85.1 ± 1.7	58.9 ± 2.2 <sup>c</sup>	85.7 ± 1.8	55.4 ± 2.5 <sup>b</sup>
4	0	91.8 ± 2.1	91.8 ± 2.1	91.8 ± 2.1	91.8 ± 2.1
	00	91.8 ± 2.1	91.3 ± 2.0	91.0 ± 2.1	89.0 ± 1.6
	45	91.4 ± 2.1	88.2 ± 2.2	87.2 ± 1.6	99.0 ± 14.2

**Taula 20.** Variació de l'STR (%) en cada subpoblació al llarg del temps (t) en funció de la dosi irradiada (D0 = control, D2 = 2 J·cm<sup>-2</sup>, D12 = 12 J·cm<sup>-2</sup> i D16 = 16 J·cm<sup>-2</sup>). Cada Sbp forma un grup independent amb cada potència. Cada grup independent està constituït per tres mesures diferents (0 = abans de la irradiació, 00 = tot just després d'irradiar, 45 = 45 minuts després d'irradiar, on 0 i 00 en el control corresponen al mateix temps). Valors amb la mateixa lletra com a superíndex no són significativament diferents entre ells, mentre que els que tenen lletra diferent si que ho són ( $p < 0.05$ ). Els resultats s'expressen en forma de mitjanes ± SEM.

Sbp \ WOB	t	D0	D2	D12	D16
1	0	46.4 ± 1.8	46.4 ± 1.8 <sup>a</sup>	46.4 ± 1.8 <sup>a</sup>	46.4 ± 1.8 <sup>a</sup>
	00	46.4 ± 1.8	57.2 ± 1.9 <sup>b</sup>	66.3 ± 2.3 <sup>b</sup>	65.2 ± 1.9 <sup>b</sup>
	45	56.7 ± 2.9	67.2 ± 2.0 <sup>b</sup>	65.1 ± 2.0 <sup>b</sup>	64.2 ± 1.8 <sup>b</sup>
2	0	53.3 ± 2.1	53.3 ± 2.1 <sup>a</sup>	53.3 ± 2.1	53.3 ± 2.1 <sup>a</sup>
	00	53.3 ± 2.1	66.9 ± 1.4 <sup>b</sup>	55.8 ± 1.6	62.1 ± 2.0 <sup>a</sup>
	45	55.4 ± 1.9	66.9 ± 1.6 <sup>b</sup>	53.2 ± 2.6	66.1 ± 1.5 <sup>b</sup>
3	0	65.8 ± 1.7	65.8 ± 1.7	65.8 ± 1.7	65.8 ± 1.7
	00	65.8 ± 1.7	61.8 ± 1.5	69.6 ± 1.6	64.6 ± 1.47
	45	62.5 ± 1.5	61.8 ± 2.0	64.2 ± 1.6	57.2 ± 2.2
4	0	71.2 ± 1.8	71.2 ± 1.8	71.2 ± 1.8	71.2 ± 1.8
	00	71.2 ± 1.8	72.6 ± 1.7	69.3 ± 1.9	64.8 ± 1.4
	45	70.2 ± 1.9	65.4 ± 1.9	63.9 ± 1.4	88.9 ± 12.5

**Taula 21.** Variació de la WOB (%) en cada subpoblació al llarg del temps (t) en funció de la dosi irradiada (D0 = control, D2 = 2 J·cm<sup>-2</sup>, D12 = 12 J·cm<sup>-2</sup> i D16 = 16 J·cm<sup>-2</sup>). Cada Sbp forma un grup independent amb cada potència. Cada grup independent està constituït per tres mesures diferents (0 = abans de la irradiació, 00 = tot just després d'irradiar, 45 = 45 minuts després d'irradiar, on 0 i 00 en el control corresponen al mateix temps). Valors amb la mateixa lletra com a superíndex no són significativament diferents entre ells, mentre que els que tenen lletra diferent si que ho són ( $p < 0.05$ ). Els resultats s'expressen en forma de mitjanes ± SEM.



Sbp \ ALHmed	t	D0	D2	D12	D16
1	0	4.51 ± 0.2	4.51 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.51 ± 0.2	4.51 ± 0.2 <sup>a</sup>
	00	4.51 ± 0.2	1.75 ± 0.2 <sup>b</sup>	3.50 ± 0.3	2.24 ± 0.2 <sup>b</sup>
	45	4.91 ± 0.4	1.59 ± 0.3 <sup>b</sup>	3.48 ± 0.2	4.87 ± 0.2 <sup>a</sup>
2	0	7.75 ± 0.3	7.75 ± 0.3 <sup>a</sup>	7.75 ± 0.3	7.75 ± 0.3 <sup>a</sup>
	00	7.75 ± 0.3	5.99 ± 0.2 <sup>b</sup>	7.52 ± 0.2	6.38 ± 0.2 <sup>b</sup>
	45	8.31 ± 0.2	5.57 ± 0.2 <sup>b</sup>	7.51 ± 0.3	6.89 ± 0.2 <sup>a</sup>
3	0	5.04 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.04 ± 0.2	5.04 ± 0.2	5.04 ± 0.2 <sup>a</sup>
	00	5.04 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.79 ± 0.2	5.10 ± 0.2	5.49 ± 0.2 <sup>a</sup>
	45	6.23 ± 0.2 <sup>b</sup>	4.91 ± 0.2	5.65 ± 0.2	7.15 ± 0.3 <sup>b</sup>
4	0	6.22 ± 0.2	6.22 ± 0.2	6.22 ± 0.2	6.22 ± 0.2
	00	6.22 ± 0.2	6.29 ± 0.2	6.88 ± 0.2	6.86 ± 0.2
	45	6.89 ± 0.2	7.20 ± 0.2	7.03 ± 0.2	4.70 ± 1.5

**Taula 22.** Variació de l'ALHmed ( $\mu\text{m}$ ) en cada subpoblació al llarg del temps (t) en funció de la dosi irradiada (D0 = control, D2 = 2 J·cm<sup>-2</sup>, D12 = 12 J·cm<sup>-2</sup> i D16 = 16 J·cm<sup>-2</sup>). Cada Sbp forma un grup independent amb cada potència. Cada grup independent està constituït per tres mesures diferents (0 = abans de la irradiació, 00 = tot just després d'irradiar, 45 = 45 minuts després d'irradiar, on 0 i 00 en el control corresponen al mateix temps). Valors amb la mateixa lletra com a superíndex no són significativament diferents entre ells, mentre que els que tenen lletra diferent si que ho són ( $p < 0.05$ ). Els resultats s'expressen en forma de mitjanes  $\pm$  SEM.

Sbp \ BCF	t	D0	D2	D12	D16
1	0	7.17 ± 0.5	7.17 ± 0.5	7.17 ± 0.5	7.17 ± 0.5
	00	7.17 ± 0.5	6.65 ± 0.5	9.06 ± 0.6	7.47 ± 0.5
	45	7.54 ± 0.8	6.92 ± 0.6	7.32 ± 0.5	8.70 ± 0.5
2	0	9.63 ± 0.6	9.63 ± 0.6	9.63 ± 0.6	9.63 ± 0.6 <sup>a</sup>
	00	9.63 ± 0.6	9.91 ± 0.4	9.34 ± 0.4	6.38 ± 0.5 <sup>b</sup>
	45	9.04 ± 0.5	8.44 ± 0.4	7.45 ± 0.7	10.4 ± 0.4 <sup>a</sup>
3	0	11.1 ± 0.5	11.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	11.1 ± 0.5	11.1 ± 0.5 <sup>a</sup>
	00	11.1 ± 0.5	8.59 ± 0.4 <sup>b</sup>	9.83 ± 0.4	9.61 ± 0.4 <sup>ab</sup>
	45	9.13 ± 0.4	7.96 ± 0.5 <sup>b</sup>	8.81 ± 0.4	7.22 ± 0.6 <sup>b</sup>
4	0	12.3 ± 0.5	12.3 ± 0.5	12.3 ± 0.5 <sup>a</sup>	12.3 ± 0.5
	00	12.3 ± 0.5	11.2 ± 0.5	11.7 ± 0.5 <sup>ab</sup>	12.3 ± 0.4
	45	11.1 ± 0.5	10.2 ± 0.5	9.82 ± 0.4 <sup>b</sup>	9.40 ± 3.4

**Taula 23.** Variació de la BCF (Hz) en cada subpoblació al llarg del temps (t) en funció de la dosi irradiada (D0 = control, D2 = 2 J·cm<sup>-2</sup>, D12 = 12 J·cm<sup>-2</sup> i D16 = 16 J·cm<sup>-2</sup>). Cada Sbp forma un grup independent amb cada potència. Cada grup independent està constituït per tres mesures diferents (0 = abans de la irradiació, 00 = tot just després d'irradiar, 45 = 45 minuts després d'irradiar, on 0 i 00 en el control corresponen al mateix temps). Valors amb la mateixa lletra com a superíndex no són significativament diferents entre ells, mentre que els que tenen lletra diferent si que ho són ( $p < 0.05$ ). Els resultats s'expressen en forma de mitjanes  $\pm$  SEM.

**D16.** La dosi més alta afectà totes les 4 Sbp, a la Sbp 1 augmentaren significativament ( $p < 0.05$ ) els valors de la VCL, VSL, VAP, STR i WOB; a la Sbp 2 augmentaren significativament ( $p < 0.05$ ) els valors de la VSL, VAP, LIN, STR i WOB; a la Sbp 3 augmentaren significativament ( $p < 0.05$ ) els valors de la VCL i l'ALHmed i disminuïren els de la VSL, LIN, STR i BCF, i per acabar a la Sbp 4 augmentaren significativament ( $p < 0.05$ ) els seus valors la VSL i la VAP (taules de la 16 a la 23).

### iii. Efectes sobre el percentatge específic de cada subpoblació espermàtica

El control a temps 0 tenia una distribució força homogènia dels espermatozoides en les diferents subpoblacions anant de la més poblada, la Sbp 1 amb el  $29.3 \pm 5.9$  % fins a la Sbp 2, on hi havia el menor percentatge  $17,5 \pm 2.9$  %. Als 45 minuts la Sbp 1 és l'única Sbp que experimentà una davallada fins als  $10.1 \pm 1.8$  % i la Sbp 3 fou la que més augmentà fins al  $41.0 \pm 2.3$  %. La D2 disminuï significativament la Sbp 1 al temps 00 i augmentà significativament ( $p < 0.05$ ) la Sbp 2 tant al temps 00 com als 45 minuts. La D12 augmentà significativament ( $p < 0.05$ ) la Sbp 2 al temps 00 i la Sbp 4 als 45 minuts. La D16 mostrà canvis significatius ( $p < 0.05$ ) augmentant la Sbp 2, disminuint la Sbp 3 i gairebé extingint la Sbp 4 (taula 24).

Sbp \ t	D0		D2		D12		D16	
	0	45	00	45	00	45	00	45
<b>1</b>	29,3 ± 5.9 <sup>a</sup>	10,1 ± 1.8 <sup>b</sup>	14,2 ± 3.5 <sup>b</sup>	21,0 ± 3.8 <sup>a</sup>	17,7 ± 2.8 <sup>ab</sup>	18,0 ± 3.6 <sup>ab</sup>	16,8 ± 3.4 <sup>ab</sup>	33,6 ± 6.7 <sup>a</sup>
<b>2</b>	17,5 ± 2.9 <sup>a</sup>	24,5 ± 2.7 <sup>ab</sup>	31,4 ± 2.4 <sup>b</sup>	33,5 ± 2.2 <sup>b</sup>	33,0 ± 1.8 <sup>b</sup>	12,3 ± 2.2 <sup>a</sup>	22,1 ± 2.5 <sup>ab</sup>	42,9 ± 4.8 <sup>c</sup>
<b>3</b>	28,4 ± 2.4 <sup>a</sup>	41,0 ± 2.3 <sup>b</sup>	34,7 ± 3.8 <sup>ab</sup>	23,6 ± 4.7 <sup>a</sup>	31,8 ± 2.3 <sup>a</sup>	31,0 ± 3.0 <sup>a</sup>	29,4 ± 1.6 <sup>a</sup>	23,0 ± 2.1 <sup>c</sup>
<b>4</b>	24,8 ± 3.9 <sup>a</sup>	24,5 ± 2.6 <sup>a</sup>	19,6 ± 3.1 <sup>a</sup>	21,8 ± 2.9 <sup>a</sup>	17,6 ± 1.6 <sup>a</sup>	38,7 ± 2.7 <sup>b</sup>	31,7 ± 3.0 <sup>ab</sup>	0,53 ± 0.3 <sup>c</sup>

**Taula 24.** Percentatge de les subpoblacions al temps 0 per al control (0) i just després d'irradiar (00), i 45 minuts després en funció de la dosi irradiada (D0 = control, D2 = 2 J·cm<sup>-2</sup>, D12 = 12 J·cm<sup>-2</sup> i D16 = 16 J·cm<sup>-2</sup>). Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) s'han marcat amb lletres com a superíndex comparant com el percentatge de cada Sbp varia en funció del temps i de la potència d'irradiació (resultats amb la mateixa lletra no són significativament diferents mentre que els que tenen diferent lletra ho són entre aquests). Els resultats s'expressen en forma de mitjanes ± SEM.

#### 4.2.4. Proves metabòliques

Ni el HOST ni la producció de L-lactat mostraren canvis estadísticament significatius respecte del control.

#### 4.3. Sèrie experimental 3 (Determinació de la tirosina fosforilada)

L'anticòs antifosfotirosina PY20 no va mostrar diferències en l'expressió de la tirosina fosforilada en les mostres irradiades en comparació amb l'esperma fresc d'onze ejaculats (imatges no mostrades).

#### 4.4. Sèrie experimental 4 (Determinació de la influència de la potència d'emissió)

La qualitat inicial de les mostres fresques (n = 21 ejaculats, 4944 espermatozoides totals analitzats) fou la següent (mitjana  $\pm$  SD): viabilitat  $88.3 \pm 6.4$  %, acrosomes alterats  $13.7 \pm 7.1$  % i anomalies morfològiques  $22.5 \pm 13.9$  %; les anomalies més importants eren la presència de gotes proximals i distals.

El semen fresc d'aquesta SE es caracteritzà per una VCL de  $123.8 \pm 0.9 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , una VSL de  $78.3 \pm 0.7 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , una VAP de  $90.6 \pm 0.7 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , una LIN de  $63.2 \pm 0.5$  %, una STR de  $85.2 \pm 0.5$  %, una WOB de  $73.5 \pm 0.5$  %, una ALHmed de  $4.14 \pm 0.1 \mu\text{m}$ , una BCF de  $10.2 \pm 0.1$  Hz i una MT de  $92.3 \pm 6.3$  %, i una viabilitat mitjana del  $88.3 \pm 1.3$  %. Els resultats s'expressen en forma de mitjanes  $\pm$  SEM (taula 27).

L'anàlisi de l'estructura mòtil de les subpoblacions espermàtiques identificà quatre tipus diferents de subpoblacions en l'ejaculat de gos, basat en les característiques de motilitat dels seus espermatozoides (taula 25). Aquestes subpoblacions mostraren les característiques següents:

**Sbp 1.** Inclou els espermatozoides amb la menor VSL ( $41.8 \pm 1.6 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) i la segona LIN ( $58.1 \pm 1.2$  %) de menor percentatge (taula 25). Aquesta Sbp representà el  $17.4 \pm 1.4$  % del total de la població espermàtica (taula 36).

**Sbp 2.** Aquesta Sbp mostrarà la segona més baixa VSL ( $58.6 \pm 1.5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) i una LIN de  $40.7 \pm 1.1$  % (taula 25), i compregué el  $38.7 \pm 1.4$  % del total de la població espermàtica (taula 36).

**Sbp 3.** Mostrà uns paràmetres majors de velocitat definits per la VSL de  $86.2 \pm 1.1 \mu\text{ms}^{-1}$ , juntament amb la segona LIN més alta ( $75.0 \pm 0.8 \%$ ) (taula 25), i compregué el  $25.7 \pm 1.5 \%$  de la població total espermàtica (taula 36).

**Sbp 4.** És la que mostrà la VSL més ràpida ( $126.8 \pm 1.3 \mu\text{ms}^{-1}$ ), juntament amb la LIN més alta ( $78.9 \pm 1.0 \%$ ) (taula 25), i representà el  $18.1 \pm 1.1 \%$  del total de la població espermàtica (taula 36).

Paràmetres de la motilitat espermàtica	Sbp 1	Sbp 2	Sbp 3	Sbp 4
VCL ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )	$73.1 \pm 1.9$	$144.4 \pm 1.9$	$115.8 \pm 1.3$	$161.9 \pm 1.7$
VSL ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )	$41.8 \pm 1.6$	$58.6 \pm 1.5$	$86.2 \pm 1.1$	$126.8 \pm 1.3$
VAP ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )	$51.2 \pm 1.5$	$85.3 \pm 1.4$	$91.6 \pm 1.0$	$134.1 \pm 1.3$
LIN (%)	$58.1 \pm 1.2$	$40.7 \pm 1.1$	$75.0 \pm 0.8$	$78.9 \pm 1.0$
STR (%)	$81.7 \pm 1.1$	$70.4 \pm 1.1$	$94.1 \pm 0.8$	$94.5 \pm 1.0$
WOB (%)	$70.7 \pm 1.0$	$60.2 \pm 1.0$	$79.6 \pm 0.7$	$83.4 \pm 0.9$
ALHmed ( $\mu\text{m}$ )	$2.74 \pm 0.1$	$5.74 \pm 0.1$	$3.58 \pm 0.1$	$4.51 \pm 0.1$
BCF (Hz)	$8.40 \pm 0.3$	$43.0 \pm 0.4$	$11.0 \pm 0.2$	$12.0 \pm 0.3$

**Taula 25.** Mitjana dels valors de la motilitat de les subpoblacions d'esperma fresc de la SE4. Els resultats s'expressen en forma de mitjanes  $\pm$  SEM.

#### 4.4.1. Efecte de les diferents potències en la viabilitat de l'esperma de gos

La viabilitat de les mostres irradiades (taula 26), als 15 minuts postirradiació, si es compara amb la mostra control no presentaren diferències significatives.

Alíquota	Viabilitat (%) als 15 min
<b>P0</b>	$83.3 \pm 0.9$
<b>P7</b>	$85.9 \pm 0.6$
<b>P15</b>	$83.1 \pm 1.4$
<b>P33</b>	$84.9 \pm 0.8$
<b>P50</b>	$83.4 \pm 1.2$

**Taula 26.** Viabilitat de les mostres irradiades a diferents potències mitjanes: P0 = control, P7 = 6.8 mW, P15 = 15.4 mW, P33 = 33.1 mW i P50 = 49.7 mW, als 15 minuts postirradiació. Els resultats s'expressen en forma de mitjanes  $\pm$  SEM.

#### 4.4.2. Efecte de les diferents potències en les característiques de motilitat de l'esperma de gos

S'observaren canvis, tant en funció de la potència d'irradiació com del temps després de la irradiació (taula 27). Els resultats obtinguts foren els següents:

**i. Canvis tot just després de la irradiació**

Immediatament després de la irradiació, les mostres manifestaren les diferències següents en funció de la potència d'irradiació (taula 27).

	t	P0	P7	P15	P33	P50
<b>VCL</b> ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )	<b>0</b>	123.8 $\pm$ 0.9	123.8 $\pm$ 0.9	123.8 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	123.8 $\pm$ 0.9	123.8 $\pm$ 0.9
	<b>00</b>	123.8 $\pm$ 0.9	124.3 $\pm$ 0.9	132.0 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	116.7 $\pm$ 0.9	121.6 $\pm$ 1.3
	<b>45</b>	124.1 $\pm$ 0.9	122.6 $\pm$ 0.9	128.2 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	122.5 $\pm$ 0.9	123.9 $\pm$ 1.2
<b>VSL</b> ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )	<b>0</b>	78.3 $\pm$ 0.7	78.3 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	78.3 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	78.3 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	78.3 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>
	<b>00</b>	78.3 $\pm$ 0.7	85.1 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	86.8 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	76.9 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	84.4 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>
	<b>45</b>	78.0 $\pm$ 0.7	78.5 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	85.9 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	82.2 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	87.1 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>
<b>VAP</b> ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )	<b>0</b>	90.5 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	90.6 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	90.6 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	90.6 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	90.6 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>
	<b>00</b>	90.5 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	96.7 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	101.6 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	86.6 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	93.0 $\pm$ 1. <sup>a</sup>
	<b>45</b>	87.2 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	90.6 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	96.7 $\pm$ 0.7 <sup>c</sup>	92.1 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	95.4 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>
<b>LIN</b> (%)	<b>0</b>	63.2 $\pm$ 0.5	63.2 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	63.2 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	63.2 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	63.2 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>
	<b>00</b>	63.2 $\pm$ 0.5	67.4 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	65.9 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	65.1 $\pm$ 0.6 <sup>ab</sup>	69.3 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>
	<b>45</b>	63.8 $\pm$ 0.5	65.2 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	67.2 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	66.4 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	69.8 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>
<b>STR</b> (%)	<b>0</b>	85.2 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	85.2 $\pm$ 0.5	85.2 $\pm$ 0.5 <sup>ab</sup>	85.2 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	85.2 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>
	<b>00</b>	85.2 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	86.3 $\pm$ 0.5	84.6 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	87.1 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	89.4 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>
	<b>45</b>	88.0 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	86.1 $\pm$ 0.6	87.3 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	88.2 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	90.2 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>
<b>WOB</b> (%)	<b>0</b>	73.5 $\pm$ 0.5	73.5 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	73.5 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	73.5 $\pm$ 0.5	73.5 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>
	<b>00</b>	73.5 $\pm$ 0.5	77.3 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	77.1 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	74.2 $\pm$ 0.5	76.6 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>
	<b>45</b>	71.4 $\pm$ 0.5	74.8 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	76.1 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	74.5 $\pm$ 0.5	76.8 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>
<b>ALHmed</b> ( $\mu\text{m}$ )	<b>0</b>	4.14 $\pm$ 0.1	4.14 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	4.1 $\pm$ 0.1	4.14 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	4.14 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
	<b>00</b>	4.14 $\pm$ 0.1	3.86 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	4.0 $\pm$ 0.1	3.81 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	3.69 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
	<b>45</b>	4.27 $\pm$ 0.1	4.03 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>	4.1 $\pm$ 0.1	4.00 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>	3.67 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
<b>BCF</b> (Hz)	<b>0</b>	10.2 $\pm$ 0.1	10.2 $\pm$ 0.1	10.2 $\pm$ 0.1	10.2 $\pm$ 0.1	10.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
	<b>00</b>	10.2 $\pm$ 0.1	10.2 $\pm$ 0.2	10.5 $\pm$ 0.2	10.6 $\pm$ 0.2	11.3 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
	<b>45</b>	10.7 $\pm$ 0.1	10.4 $\pm$ 0.2	10.6 $\pm$ 0.2	10.5 $\pm$ 0.2	11.4 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
<b>MT</b> (%)	<b>0</b>	92.3 $\pm$ 6.3	92.3 $\pm$ 6.3	92.3 $\pm$ 6.3	92.3 $\pm$ 6.3	92.3 $\pm$ 6.3
	<b>00</b>	92.3 $\pm$ 6.3	89.4 $\pm$ 8.4	87.9 $\pm$ 8.0	92.1 $\pm$ 6.2	92.5 $\pm$ 4.8
	<b>45</b>	88.7 $\pm$ 10.6	90.3 $\pm$ 6.4	90.4 $\pm$ 6.4	91.5 $\pm$ 5.9	93.8 $\pm$ 6.7

**Taula 27.** Evolució dels diferents paràmetres de motilitat al llarg del temps (t) depenent de la potència de sortida de la irradiació (P0 = control, P7 = 6.8 mW, P15 = 15.4 mW, P33 = 33.1 mW i P50 = 49.7 mW). Cada grup independent està constituït per tres mesures diferents (0 = abans de la irradiació, 00 = tot just després d'irradiar, 45 = 45 minuts després d'irradiar, on 0 i 00 en el control corresponen al mateix temps). Valors amb la mateixa lletra com a superíndex no són significativament diferents entre ells, mentre que els que tenen lletra diferent si que ho són ( $p < 0.05$ ). Els resultats s'expressen en forma de mitjanes  $\pm$  SEM.

**P7.** La potència més baixa d'irradiació augmentà significativament ( $p < 0.05$ ), si es compara amb P0, els valors de la VSL, VAP, LIN i WOB, mentre que l'ALHmed els va disminuir (taula 27).

**P15.** La segona potència augmentà significativament ( $p < 0.05$ ), si es compara amb P0, els valors de la VCL, VSL, LIN i WOB (taula 27).

**P33.** Aquesta potència de sortida augmentà significativament ( $p < 0.05$ ) el valor de la VSL, mentre que la VAP i l'ALHmed disminuïren significativament els seus valors si es compara amb P0 (taula 27).

**P50.** La major potència de sortida augmentà significativament ( $p < 0.05$ ) els valors de la VSL, LIN, STR, WOB i BCF, mentre que l'ALHmed va disminuir significativament els seus valors si es compara amb P0 (taula 27).

## **ii. Canvis als 45 minuts posteriors a la irradiació**

**P0.** L'STR augmentà i la VAP va disminuir significativament ( $p < 0.05$ ) respecte al temps 0 (taula 27).

**P7.** No va afectar significativament ( $p < 0.05$ ) cap paràmetre de motilitat als 45 minuts posteriors a la irradiació, un cop comparat amb P0 al temps 0 (taula 27).

**P15.** La irradiació a aquesta potència augmentà significativament ( $p < 0.05$ ) els valors de la VCL, VSL, VAP, LIN i WOB si es compara amb P0 al temps 0 (taula 27).

**P33.** La tercera potència de sortida, als 45 minuts postirradiació augmentà significativament ( $p < 0.05$ ) els valors de la VSL, LIN i STR si es compara amb P0 al temps 0 (taula 27).

**P50.** Va augmentar significativament ( $p < 0.05$ ) els valors de la VSL, VAP, LIN, STR, WOB i BCF, mentre que disminuï significativament ( $p < 0.05$ ) els valors de l'ALHmed en comparar-los amb P0 al temps 0 (taula 27).

#### **4.4.3. Efecte de les diferents potències en les subpoblacions de l'esperma caní**

Una altra vegada, la irradiació de l'esperma de gos amb 3.34 J a diferents potències de sortida, va induir diferents efectes en funció tant de la potència de sortida com del temps transcorregut després de la irradiació (taules de la 28 a la 35). Els resultats obtinguts foren els següents:

##### **i. Canvis just després de la irradiació:**

**P7.** La potència més baixa afectà significativament ( $p < 0.05$ ) i principalment la Sbp 3 (en la VSL, VAP, LIN i WOB), i la VAP i la WOB en la Sbp 2, i la VCL i la VSL en la Sbp 4, però en cap cas afectà la Sbp més lenta (Sbp1). Els valors augmentaren en tots els paràmetres afectats (taules de la 28 a la 35).

**P15.** Com s'esdevení amb P7, totes les diferències observades, després de la irradiació, amb la segona potència més baixa, afectaren significativament la Sbp 2 (VCL, VAP, STR i WOB) i les Sbp 3 i 4 (VSL i VAP), però no pas la Sbp 1. A part de l'STR de la Sbp 2, tots els paràmetres afectats augmentaren els seus valors (taules de la 28 a la 35).

**P33.** Aquesta potència de sortida afectà significativament ( $p < 0.05$ ), augmentant els valors afectats de la Sbp 2 (LIN i STR) i disminuint els valors en la VCL, VAP i ALHmed, mentre que a la Sbp 3 els disminuï (VCL, VAP i ALHmed) (taules de la 28 a la 35).

**P50.** La potència més alta fou l'única potència que afectà, significativament ( $p < 0.05$ ) i principalment, les subpoblacions 1 i 2, en la Sbp 3 només s'afectà la VCL i no s'afectà cap paràmetre en la Sbp 4. Els valors augmentaren per la Sbp 1 en la VCL, VAP i ALHmed, mentre que disminuïren per la LIN i la WOB, en la Sbp 2 els valors

VCL Sbp	t	P0	P7	P15	P33	P50
1	0	73.1 ± 1.9	73.1 ± 1.9	73.1 ± 1.9	73.1 ± 1.9	73.1 ± 1.9 <sup>a</sup>
	00	73.1 ± 1.9	70.3 ± 2.2	81.0 ± 1.9	71.0 ± 1.8	125.1 ± 3.5 <sup>b</sup>
	45	64.9 ± 1.7	66.1 ± 2.3	79.7 ± 1.4	68.2 ± 1.8	79.6 ± 2.2 <sup>a</sup>
2	0	144.4 ± 1.9 <sup>a</sup>	144.4 ± 1.9 <sup>a</sup>	144.4 ± 1.9 <sup>a</sup>	144.4 ± 1.9	144.4 ± 1.9 <sup>a</sup>
	00	144.4 ± 1.9 <sup>a</sup>	141.9 ± 2.1 <sup>a</sup>	157.4 ± 2.5 <sup>b</sup>	137.2 ± 2.0	78.6 ± 2.4 <sup>b</sup>
	45	163.1 ± 2.1 <sup>b</sup>	158.9 ± 2.2 <sup>b</sup>	151.3 ± 2.2 <sup>ab</sup>	140.1 ± 2.3	138.0 ± 3.1 <sup>a</sup>
3	0	115.8 ± 1.3	115.8 ± 1.3 <sup>ab</sup>	115.8 ± 1.3	115.8 ± 1.3 <sup>a</sup>	115.8 ± 1.3
	00	115.8 ± 1.3	121.4 ± 1.4 <sup>a</sup>	123.2 ± 1.4	105.2 ± 1.5 <sup>b</sup>	119.3 ± 1.7
	45	112.7 ± 1.3	111.7 ± 1.4 <sup>b</sup>	121.4 ± 1.5	120.2 ± 1.4 <sup>a</sup>	118.0 ± 1.5
4	0	161.9 ± 1.7	161.9 ± 1.7 <sup>ab</sup>	161.9 ± 1.7	161.9 ± 1.7	161.9 ± 1.7
	00	161.9 ± 1.7	163.8 ± 1.6 <sup>a</sup>	166.3 ± 1.9	153.5 ± 1.8	163.4 ± 2.3
	45	155.8 ± 1.8	153.7 ± 1.5 <sup>b</sup>	160.5 ± 2.3	161.2 ± 2.0	159.9 ± 2.7

**Taula 28.** Variació de la VCL ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) en cada subpoblació al llarg del temps (t) en funció de les diferents potències d'irradiació (P0 = control, P7 = 6.8 mW, P15 = 15.4 mW, P33 = 33.1 mW i P50 = 49.7 mW). Cada Sbp forma un grup independent amb cada potència. Cada grup independent està constituït per tres mesures diferents (0 = abans de la irradiació, 00 = tot just després d'irradiar, 45 = 45 minuts després d'irradiar, on 0 i 00 en el control corresponen al mateix temps). Valors amb la mateixa lletra com a superíndex no són significativament diferents entre ells, mentre que els que tenen lletra diferent si que ho són ( $p < 0.05$ ). Els resultats s'expressen en forma de mitjanes  $\pm$  SEM.

VSL Sbp	t	P0	P7	P15	P33	P50
1	0	41.8 ± 1.6	41.8 ± 1.6	41.8 ± 1.6	41.8 ± 1.6	41.8 ± 1.6 <sup>a</sup>
	00	41.8 ± 1.6	41.3 ± 1.8	49.9 ± 1.5	36.7 ± 1.5	53.8 ± 2.8 <sup>ab</sup>
	45	37.6 ± 1.4	39.4 ± 1.8	48.5 ± 1.1	41.4 ± 1.5	51.3 ± 1.8 <sup>b</sup>
2	0	58.6 ± 1.5 <sup>a</sup>	58.6 ± 1.5	58.6 ± 1.5	58.6 ± 1.5	58.6 ± 1.5
	00	58.6 ± 1.5 <sup>a</sup>	65.7 ± 1.7	63.6 ± 2.0	66.9 ± 1.6	56.8 ± 1.9
	45	67.7 ± 1.7 <sup>b</sup>	65.7 ± 1.8	63.1 ± 1.8	62.3 ± 1.9	66.0 ± 2.5
3	0	86.2 ± 1.1	86.2 ± 1.1 <sup>a</sup>	86.2 ± 1.1 <sup>a</sup>	86.2 ± 1.1 <sup>a</sup>	86.2 ± 1.1 <sup>a</sup>
	00	86.2 ± 1.1	96.8 ± 1.1 <sup>b</sup>	95.3 ± 1.1 <sup>b</sup>	81.0 ± 1.2 <sup>a</sup>	93.6 ± 1.4 <sup>b</sup>
	45	83.3 ± 1.1	83.0 ± 1.1 <sup>a</sup>	96.9 ± 1.2 <sup>b</sup>	92.3 ± 1.1 <sup>b</sup>	94.2 ± 1.2 <sup>b</sup>
4	0	126.8 ± 1.3	126.8 ± 1.3 <sup>a</sup>	126.8 ± 1.3 <sup>a</sup>	126.8 ± 1.3 <sup>ab</sup>	126.8 ± 1.3
	00	126.8 ± 1.3	136.7 ± 1.3 <sup>b</sup>	138.6 ± 1.5 <sup>b</sup>	122.9 ± 1.4 <sup>a</sup>	133.1 ± 1.9
	45	123.5 ± 1.5	126.0 ± 1.2 <sup>a</sup>	135.1 ± 1.8 <sup>ab</sup>	132.8 ± 1.6 <sup>b</sup>	136.8 ± 2.2

**Taula 29.** Variació de la VSL ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) en cada subpoblació al llarg del temps (t) en funció de les diferents potències d'irradiació (P0 = control, P7 = 6.8 mW, P15 = 15.4 mW, P33 = 33.1 mW i P50 = 49.7 mW). Cada Sbp forma un grup independent amb cada potència. Cada grup independent està constituït per tres mesures diferents (0 = abans de la irradiació, 00 = tot just després d'irradiar, 45 = 45 minuts després d'irradiar, on 0 i 00 en el control corresponen al mateix temps). Valors amb la mateixa lletra com a superíndex no són significativament diferents entre ells, mentre que els que tenen lletra diferent si que ho són ( $p < 0.05$ ). Els resultats s'expressen en forma de mitjanes  $\pm$  SEM.



que augmentaren foren la LIN, STR i WOB mentre que disminuïren els de la VCL, VAP i ALHmed (taules de la 28 a la 35).

## ii. Canvis als 45 minuts posteriors a la irradiació.

**P0.** Es veieren canvis significatius ( $p < 0.05$ ) només en la Sbp 2, que mostrà augments en la VCL, VSL i STR, cap dels paràmetres estudiats es veieren alterats en les altres subpoblacions (taules de la 28 a la 35).

**P7.** La potència més baixa afectà significativament ( $p < 0.05$ ) sols les subpoblacions 2 i 4. La Sbp 2 mostrà un augment dels valors de la VCL, VAP i ALHmed. La Sbp 4 mostrà un augment de la LIN i una disminució de l'ALHmed (taules de la 28 a la 35).

**P15.** Aquesta potència augmentà significativament ( $p < 0.05$ ) la VAP de la Sbp 1 i la VSL, VAP, LIN i WOB de la Sbp 3 (taules de la 28 a la 35).

**P33.** La tercera potència augmentà significativament ( $p < 0.05$ ) la STR de la Sbp 1 i la VSL de la Sbp 3 (taules de la 28 a la 35).

**P50.** La potència més alta augmentà significativament ( $p < 0.05$ ) la VSL, STR i BCF de la Sbp 1 i la VSL, VAP i LIN de la Sbp 3 (taules de la 28 a la 35).

## iii. Efectes sobre el percentatge específic de cada subpoblació espermàtica

P0 al temps 0 mostrà un predomini de la Sbp 2, seguit de la 3, 4 i la Sbp 1, respectivament. Als 45 minuts disminuïren significativament ( $p < 0.05$ ) les Sbp 1 i 2 i augmentà significativament ( $p < 0.05$ ) la Sbp 4. Com s'esdevingué amb els altres paràmetres estudiats, la irradiació làser tingué un efecte immediat, tot just després de la irradiació, sobre la distribució de les subpoblacions espermàtiques: P7 donà disminucions significatives ( $p < 0.05$ ) de les Sbp 1 i 2, mentre que augmentà significativament ( $p < 0.05$ ) la 3 i 4; P15 augmentà significativament ( $p < 0.05$ ) tot just després de la irradiació les Sbp 1 i 4, i disminuïren significativament ( $p < 0.05$ ) les Sbp 2

VAP Sbp	t	P0	P7	P15	P33	P50
1	0	51.2 ± 1.5	51.2 ± 1.5	51.2 ± 1.5 <sup>a</sup>	51.2 ± 1.5	51.2 ± 1.5 <sup>a</sup>
	00	51.2 ± 1.5	49.2 ± 1.7	57.7 ± 1.4 <sup>ab</sup>	47.8 ± 1.4	76.0 ± 2.7 <sup>b</sup>
	45	44.4 ± 1.3	46.5 ± 1.8	58.7 ± 1.1 <sup>b</sup>	46.5 ± 1.4	56.1 ± 1.7 <sup>a</sup>
2	0	85.3 ± 1.4	85.3 ± 1.4 <sup>a</sup>	85.3 ± 1.4 <sup>a</sup>	85.3 ± 1.4	85.3 ± 1.4 <sup>a</sup>
	00	85.3 ± 1.4	94.1 ± 1.6 <sup>b</sup>	105.4 ± 2.0 <sup>b</sup>	85.9 ± 1.6	60.9 ± 1.9 <sup>b</sup>
	45	87.7 ± 1.6	96.6 ± 1.7 <sup>b</sup>	86.3 ± 1.7 <sup>a</sup>	86.8 ± 1.8	86.2 ± 2.4 <sup>a</sup>
3	0	91.6 ± 1.0	91.6 ± 1.0 <sup>a</sup>	91.6 ± 1.0 <sup>a</sup>	91.6 ± 1.0 <sup>a</sup>	91.6 ± 1.0 <sup>a</sup>
	00	91.6 ± 1.0	101.9 ± 1.1 <sup>b</sup>	100.2 ± 1.1 <sup>b</sup>	85.2 ± 1.1 <sup>b</sup>	97.9 ± 3.0 <sup>ab</sup>
	45	88.4 ± 1.0	88.5 ± 1.1 <sup>a</sup>	102.2 ± 1.1 <sup>b</sup>	96.9 ± 1.1 <sup>ac</sup>	98.1 ± 1.2 <sup>b</sup>
4	0	134.1 ± 1.3	134.1 ± 1.3 <sup>a</sup>	134.1 ± 1.3 <sup>a</sup>	134.1 ± 1.3 <sup>ab</sup>	134.1 ± 1.3
	00	134.1 ± 1.3	141.3 ± 1.2 <sup>b</sup>	143.1 ± 1.5 <sup>b</sup>	127.5 ± 1.4 <sup>a</sup>	137.3 ± 1.8
	45	128.4 ± 1.4	130.8 ± 1.2 <sup>a</sup>	139.6 ± 1.7 <sup>ab</sup>	138.3 ± 1.5 <sup>b</sup>	141.3 ± 2.1

**Taula 30.** Variació de la VAP ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) en cada subpoblació al llarg del temps (t) en funció de les diferents potències d'irradiació (P0 = control, P7 = 6.8 mW, P15 = 15.4 mW, P33 = 33.1 mW i P50 = 49.7 mW). Cada Sbp forma un grup independent amb cada potència. Cada grup independent està constituït per tres mesures diferents (0 = abans de la irradiació, 00 = tot just després d'irradiar, 45 = 45 minuts després d'irradiar, on 0 i 00 en el control corresponen al mateix temps). Valors amb la mateixa lletra com a superíndex no són significativament diferents entre ells, mentre que els que tenen lletra diferent si que ho són ( $p < 0.05$ ). Els resultats s'expressen en forma de mitjanes  $\pm$  SEM.

LIN Sbp	t	P0	P7	P15	P33	P50
1	0	58.1 ± 1.2	58.1 ± 1.2	58.1 ± 1.2	58.1 ± 1.2 <sup>ab</sup>	58.1 ± 1.2 <sup>a</sup>
	00	58.1 ± 1.2	59.0 ± 1.4	61.9 ± 1.1	53.4 ± 1.1 <sup>a</sup>	42.9 ± 2.1 <sup>b</sup>
	45	58.9 ± 1.1	61.9 ± 1.4	61.7 ± 0.9	60.4 ± 1.1 <sup>b</sup>	64.9 ± 1.4 <sup>a</sup>
2	0	40.7 ± 1.1	40.7 ± 1.1	40.7 ± 1.1	40.7 ± 1.1 <sup>a</sup>	40.7 ± 1.1 <sup>a</sup>
	00	40.7 ± 1.1	46.4 ± 1.3	40.3 ± 1.6	48.9 ± 1.2 <sup>b</sup>	72.7 ± 1.5 <sup>b</sup>
	45	41.9 ± 1.3	41.1 ± 1.4	42.1 ± 1.4	44.9 ± 1.4 <sup>ab</sup>	48.4 ± 1.9 <sup>a</sup>
3	0	75.0 ± 0.8	75.0 ± 0.8 <sup>a</sup>	75.0 ± 0.8 <sup>a</sup>	75.0 ± 0.8	75.0 ± 0.8 <sup>a</sup>
	00	75.0 ± 0.8	80.2 ± 0.8 <sup>b</sup>	77.8 ± 0.9 <sup>a</sup>	77.4 ± 0.9	79.3 ± 1.0 <sup>a</sup>
	45	74.6 ± 0.8	74.9 ± 0.9 <sup>a</sup>	80.3 ± 0.9 <sup>b</sup>	77.2 ± 0.9	80.1 ± 1.0 <sup>b</sup>
4	0	78.9 ± 1.0	78.9 ± 1.0 <sup>a</sup>	78.9 ± 1.0	78.9 ± 1.0	78.9 ± 1.0
	00	78.9 ± 1.0	83.9 ± 1.0 <sup>ab</sup>	83.6 ± 1.2	80.7 ± 1.1	82.2 ± 1.4
	45	79.9 ± 1.1	82.8 ± 0.9 <sup>b</sup>	84.7 ± 1.4	82.8 ± 1.2	85.6 ± 1.7

**Taula 31.** Variació de la LIN (%) en cada subpoblació al llarg del temps (t) en funció de les diferents potències d'irradiació (P0 = control, P7 = 6.8 mW, P15 = 15.4 mW, P33 = 33.1 mW i P50 = 49.7 mW). Cada Sbp forma un grup independent amb cada potència. Cada grup independent està constituït per tres mesures diferents (0 = abans de la irradiació, 00 = tot just després d'irradiar, 45 = 45 minuts després d'irradiar, on 0 i 00 en el control corresponen al mateix temps). Valors amb la mateixa lletra com a superíndex no són significativament diferents entre ells, mentre que els que tenen lletra diferent si que ho són ( $p < 0.05$ ). Els resultats s'expressen en forma de mitjanes  $\pm$  SEM.

STR Sbp	t	P0	P7	P15	P33	P50
1	0	81.7 ± 1.1	81.7 ± 1.1	81.7 ± 1.1	81.7 ± 1.1 <sup>a</sup>	81.7 ± 1.1 <sup>a</sup>
	00	81.7 ± 1.1	81.8 ± 1.3	85.1 ± 1.1	78.0 ± 1.1 <sup>a</sup>	72.3 ± 2.0 <sup>a</sup>
	45	83.6 ± 1.0	85.1 ± 1.3	82.8 ± 0.8	87.8 ± 1.0 <sup>b</sup>	90.3 ± 1.3 <sup>b</sup>
2	0	70.4 ± 1.1 <sup>a</sup>	70.4 ± 1.1	70.4 ± 1.1 <sup>a</sup>	70.4 ± 1.1 <sup>a</sup>	70.4 ± 1.1 <sup>a</sup>
	00	70.4 ± 1.1 <sup>a</sup>	71.7 ± 1.2	61.7 ± 1.5 <sup>b</sup>	79.2 ± 1.2 <sup>b</sup>	92.8 ± 1.4 <sup>b</sup>
	45	77.9 ± 1.2 <sup>b</sup>	69.4 ± 1.3	74.6 ± 1.3 <sup>a</sup>	73.7 ± 1.4 <sup>ab</sup>	77.9 ± 1.8 <sup>a</sup>
3	0	94.1 ± 0.8	94.1 ± 0.8	94.9 ± 0.8	94.1 ± 0.8	94.01 ± 0.8
	00	94.1 ± 0.8	95.0 ± 0.8	95.0 ± 0.8	94.9 ± 0.9	95.6 ± 1.0
	45	94.3 ± 0.8	93.8 ± 0.8	94.9 ± 0.9	95.3 ± 0.8	96.0 ± 0.9
4	0	94.5 ± 1.0	94.5 ± 1.0	94.5 ± 1.0	94.5 ± 1.0	94.5 ± 1.0
	00	94.5 ± 1.0	96.7 ± 0.9	96.8 ± 1.1	96.3 ± 1.0	96.9 ± 1.3
	45	96.2 ± 1.1	96.3 ± 0.9	96.7 ± 1.3	95.9 ± 1.1	96.8 ± 1.6

**Taula 32.** Variació de l'STR (%) en cada subpoblació al llarg del temps (t) en funció de les diferents potències d'irradiació (P0 = control, P7 = 6.8 mW, P15 = 15.4 mW, P33 = 33.1 mW i P50 = 49.7 mW). Cada Sbp forma un grup independent amb cada potència. Cada grup independent està constituït per tres mesures diferents (0 = abans de la irradiació, 00 = tot just després d'irradiar, 45 = 45 minuts després d'irradiar, on 0 i 00 en el control corresponen al mateix temps). Valors amb la mateixa lletra com a superíndex no són significativament diferents entre ells, mentre que els que tenen lletra diferent si que ho són ( $p < 0.05$ ). Els resultats s'expressen en forma de mitjanes ± SEM.

WOB Sbp	t	P0	P7	P15	P33	P50
1	0	70.7 ± 1.0	70.7 ± 1.0	70.7 ± 1.0	70.7 ± 1.0	70.7 ± 1.0 <sup>a</sup>
	00	70.7 ± 1.0	71.1 ± 1.2	71.9 ± 1.0	68.6 ± 1.0	60.6 ± 1.9 <sup>b</sup>
	45	69.4 ± 0.9	71.6 ± 1.2	74.3 ± 0.8	68.2 ± 1.0	71.5 ± 1.2 <sup>a</sup>
2	0	60.2 ± 1.0	60.2 ± 1.0 <sup>a</sup>	60.2 ± 1.0 <sup>a</sup>	60.2 ± 1.0	60.2 ± 1.0 <sup>a</sup>
	00	60.2 ± 1.0	67.1 ± 1.1 <sup>b</sup>	68.3 ± 1.4 <sup>b</sup>	63.0 ± 1.1	78.1 ± 1.3 <sup>b</sup>
	45	54.5 ± 1.1	61.9 ± 1.2 <sup>ab</sup>	58.1 ± 1.2 <sup>a</sup>	62.5 ± 1.2	63.9 ± 1.6 <sup>a</sup>
3	0	79.6 ± 0.7	79.6 ± 0.7 <sup>a</sup>	79.6 ± 0.7 <sup>a</sup>	79.6 ± 0.7	79.6 ± 0.7
	00	79.6 ± 0.7	84.4 ± 0.7 <sup>b</sup>	81.9 ± 0.7 <sup>ab</sup>	81.4 ± 0.8	82.8 ± 0.9
	45	78.9 ± 0.7	79.8 ± 0.7 <sup>a</sup>	84.6 ± 0.8 <sup>b</sup>	81.0 ± 0.8	83.4 ± 0.8
4	0	83.4 ± 1.0	83.4 ± 0.9	83.4 ± 0.9	83.4 ± 0.9	83.4 ± 0.9
	00	83.4 ± 1.0	86.7 ± 0.8	86.3 ± 1.0	83.7 ± 1.0	84.7 ± 1.2
	45	283.0 ± 1.0	85.8 ± 0.8	87.5 ± 1.2	86.3 ± 1.1	88.4 ± 1.5

**Taula 33.** Variació de la WOB (%) en cada subpoblació al llarg del temps (t) en funció de les diferents potències d'irradiació (P0 = control, P7 = 6.8 mW, P15 = 15.4 mW, P33 = 33.1 mW i P50 = 49.7 mW). Cada Sbp forma un grup independent amb cada potència. Cada grup independent està constituït per tres mesures diferents (0 = abans de la irradiació, 00 = tot just després d'irradiar, 45 = 45 minuts després d'irradiar, on 0 i 00 en el control corresponen al mateix temps). Valors amb la mateixa lletra com a superíndex no són significativament diferents entre ells, mentre que els que tenen lletra diferent si que ho són ( $p < 0.05$ ). Els resultats s'expressen en forma de mitjanes ± SEM.

ALHmed Sbp	t	P0	P7	P15	P33	P50
1	0	2.74 ± 0.1	2.74 ± 0.1	2.74 ± 0.1	2.74 ± 0.1	2.74 ± 0.1 <sup>a</sup>
	00	2.74 ± 0.1	2.69 ± 0.1	2.83 ± 0.1	2.73 ± 0.1	4.71 ± 0.2 <sup>b</sup>
	45	2.54 ± 0.1	2.55 ± 0.1	2.77 ± 0.1	2.57 ± 0.1	2.72 ± 0.1 <sup>a</sup>
2	0	5.74 ± 0.1	5.74 ± 0.1 <sup>ab</sup>	5.74 ± 0.1	5.74 ± 0.1	5.74 ± 0.1 <sup>a</sup>
	00	5.74 ± 0.1	5.23 ± 0.1 <sup>a</sup>	5.46 ± 0.2	5.16 ± 0.1	2.60 ± 0.1 <sup>b</sup>
	45	6.62 ± 0.1	6.13 ± 0.1 <sup>b</sup>	6.17 ± 0.1	5.63 ± 0.1	4.91 ± 0.2 <sup>a</sup>
3	0	3.58 ± 0.1	3.58 ± 0.1	3.58 ± 0.1	3.58 ± 0.1 <sup>a</sup>	3.58 ± 0.1
	00	3.58 ± 0.1	3.41 ± 0.1	3.48 ± 0.1	3.16 ± 0.1 <sup>b</sup>	3.32 ± 0.1
	45	3.44 ± 0.1	3.41 ± 0.1	3.35 ± 0.1	3.56 ± 0.1 <sup>a</sup>	13.26 ± 0.1
4	0	4.51 ± 0.1	4.51 ± 0.1 <sup>a</sup>	4.51 ± 0.1	4.51 ± 0.1	4.51 ± 0.1
	00	4.51 ± 0.1	4.11 ± 0.1 <sup>ab</sup>	4.15 ± 0.1	4.19 ± 0.1	4.13 ± 0.1
	45	4.47 ± 0.1	4.02 ± 0.1 <sup>b</sup>	3.96 ± 0.1	4.23 ± 0.1	3.78 ± 0.2

**Taula 34.** Variació de l'ALHmed ( $\mu\text{m}$ ) en cada subpoblació al llarg del temps (t) en funció de les diferents potències d'irradiació (P0 = control, P7 = 6.8 mW, P15 = 15.4 mW, P33 = 33.1 mW i P50 = 49.7 mW). Cada Sbp forma un grup independent amb cada potència. Cada grup independent està constituït per tres mesures diferents (0 = abans de la irradiació, 00 = tot just després d'irradiar, 45 = 45 minuts després d'irradiar, on 0 i 00 en el control corresponen al mateix temps). Valors amb la mateixa lletra com a superíndex no són significativament diferents entre ells, mentre que els que tenen lletra diferent si que ho són ( $p < 0.05$ ). Els resultats s'expressen en forma de mitjanes  $\pm$  SEM.

BCF Sbp	t	P0	P7	P15	P33	P50
1	0	8.40 ± 0.3	8.40 ± 0.3	8.40 ± 0.3	8.40 ± 0.3	8.40 ± 0.3
	00	8.40 ± 0.3	8.73 ± .4	9.60 ± 0.3	9.98 ± 0.3	10.5 ± 0.6
	45	9.11 ± 0.3	8.99 ± 0.3	9.61 ± 0.2	9.98 ± 0.3	11.1 ± 0.4 <sup>b</sup>
2	0	43 ± 0.4	43 ± 0.4	43.0 ± 0.4	43 ± 0.4	43 ± 0.4
	00	43 ± 0.4	90.8 ± 0.4	8.76 ± 0.4	10.43 ± 0.3	10.3 ± 0.4
	45	10.1 ± 0.3	9.77 ± 0.4	9.42 ± 0.4	9.23 ± 0.4	11.2 ± 0.5
3	0	11.0 ± 0.2	10.99 ± 0.2	11.0 ± 0.2	11.0 ± 0.2	11.0 ± 0.2
	00	11.0 ± 0.2	11.0 ± 0.2	11.9 ± 0.2	11.1 ± 0.2	11.8 ± 0.3
	45	11.6 ± 0.2	11.1 ± 0.2	11.5 ± 0.2	11.4 ± 0.2	11.7 ± 0.3
4	0	12.0 ± 0.3	12.0 ± 0.3	12.0 ± 0.3	12.0 ± 0.3	12.0 ± 0.3
	00	12.0 ± 0.3	12.0 ± 0.3	11.9 ± 0.3	11.9 ± 0.3	12.6 ± 0.4
	45	11.9 ± 0.3	11.5 ± 0.3	11.8 ± 0.37	11.3 ± 0.3	11.7 ± 0.5

**Taula 35.** Variació de la BCF (Hz) en cada subpoblació al llarg del temps (t) en funció de les diferents potències d'irradiació (P0 = control, P7 = 6.8 mW, P15 = 15.4 mW, P33 = 33.1 mW i P50 = 49.7 mW). Cada Sbp forma un grup independent amb cada potència. Cada grup independent està constituït per tres mesures diferents (0 = abans de la irradiació, 00 = tot just després d'irradiar, 45 = 45 minuts després d'irradiar, on 0 i 00 en el control corresponen al mateix temps). Valors amb la mateixa lletra com a superíndex no són significativament diferents entre ells, mentre que els que tenen lletra diferent si que ho són ( $p < 0.05$ ). Els resultats s'expressen en forma de mitjanes  $\pm$  SEM.

Sbp \t	P0		P7		P15		P33		P50	
	0	45	00	45	00	45	00	45	00	45
1	17.4 ±1.4 <sup>a</sup>	14.4± 1.1 <sup>b</sup>	14.3± 1.3 <sup>b</sup>	13.4± 0.8 <sup>b</sup>	22.1± 1.5 <sup>c</sup>	31.4± 2.1 <sup>d</sup>	20.2±1. 2 <sup>ac</sup>	23.1± 1.5 <sup>c</sup>	41.9± 2.1 <sup>e</sup>	11.9± 1.0 <sup>b</sup>
2	38.7 ±1.4 <sup>a</sup>	23.8± 1.2 <sup>b</sup>	15.7± 1.3 <sup>c</sup>	14.1± 1.1 <sup>c</sup>	23.5± 1.3 <sup>b</sup>	20.5± 1.5 <sup>b</sup>	20.1±1. 1 <sup>b</sup>	40.9± 1.6 <sup>a</sup>	11.2± 1.2 <sup>d</sup>	49.0± 2.5 <sup>e</sup>
3	25.7 ±1.5 <sup>a</sup>	22.5± 0.8 <sup>a</sup>	40.9± 1.7 <sup>b</sup>	38.2± 0.9 <sup>b</sup>	12.5± 0.9 <sup>c</sup>	13.9± 1.7 <sup>c</sup>	35.7±1. 5 <sup>b</sup>	21.7± 1.2 <sup>a</sup>	21.0± 1.8 <sup>a</sup>	20.9± 2.3 <sup>a</sup>
4	18.1 ±1.1 <sup>a</sup>	39.2± 1.3 <sup>b</sup>	29.1± 1.8 <sup>c</sup>	34.3± 1.3 <sup>d</sup>	41.8± 1.4 <sup>b</sup>	34.2± 1.6 <sup>d</sup>	23.9±1. 3 <sup>e</sup>	14.3± 0.7 <sup>f</sup>	25.8± 2.3 <sup>e</sup>	18.1± 2.2 <sup>a</sup>

**Taula 36.** Percentatge de les subpoblacions al temps 0 per al control (0) i just després d'irradiar (00), i 45 minuts després en funció de les diferents potències d'irradiació (P0 = control, P7 = 6.8 mW, P15 = 15.4 mW, P33 = 33.1 mW i P50 = 49.7 mW). Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) s'han marcat amb lletres com a superíndex comparant com el percentatge de cada Sbp varia en funció del temps i de la potència d'irradiació. Valors amb la mateixa lletra com a superíndex no són significativament diferents entre ells, mentre que els que tenen lletra diferent si que ho són ( $p < 0.05$ ). Els resultats s'expressen en forma de mitjanes  $\pm$  SEM.

i 3; P33 disminuí significativament ( $p < 0.05$ ) la Sbp 2 i augmentà significativament ( $p < 0.05$ ) les Sbp 3 i 4; finalment, P50 augmentà significativament ( $p < 0.05$ ) les Sbp 1 i 4, i disminuí significativament ( $p < 0.05$ ) la Sbp 2. Als 45 minuts també es veieren canvis: P7 disminuí significativament ( $p < 0.05$ ) respecte del control al temps 0 les Sbp 1 i 2, i augmentà significativament ( $p < 0.05$ ) les Sbp 2 i 4; P15 augmentà significativament ( $p < 0.05$ ) les Sbp 1 i 4, i disminuí significativament ( $p < 0.05$ ) les Sbp 2 i 3; P33 augmentà significativament ( $p < 0.05$ ) la Sbp 1 i disminuí significativament ( $p < 0.05$ ) la Sbp 4; per acabar, P50 disminuí significativament ( $p < 0.05$ ) la Sbp 1 (taula 36).

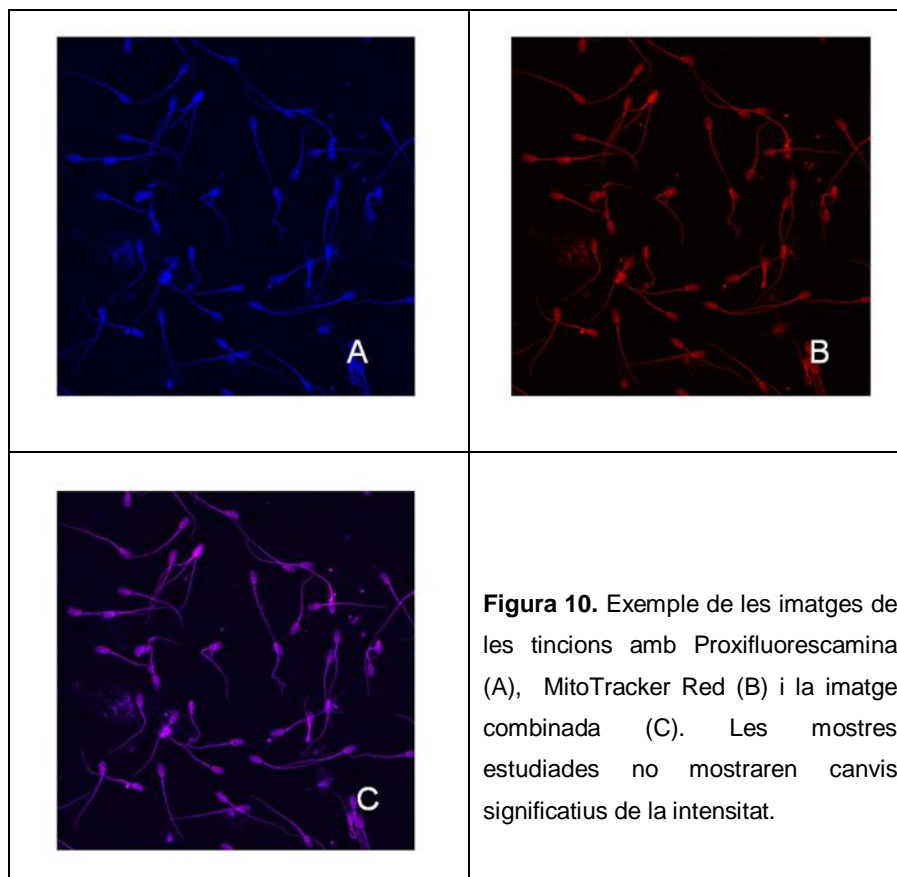
#### 4.4.4. Proves metabòliques

Ni el HOST ni la producció de L-lactat mostraren canvis estadísticament significatius (dades no mostrades).

#### 4.5. Sèrie experimental 5 (Determinació d'espècies reactives d'oxigen)

La qualitat inicial de les mostres fresques ( $n = 7$  ejaculats) fou la següent (mitjana  $\pm$  SD): viabilitat  $90.3 \pm 9.6$  %, acrosomes alterats  $9.7 \pm 6.6$  % i anomalies morfològiques  $30.4 \pm 22.9$  %; les anomalies més importants eren la presència de gotes proximals i distals.

No es trobaren diferències significatives en l'expressió de les ROS entre el grup control i els irradiats (P7 i P50) en comparar els valors de les mitjanes d'intensitat de blaus i vermells (figura 10).



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DíODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES

Marc-Ignasi Corral-Baqués

ISBN/ DL:T.1240-201

*Resposta de la motilitat espermàtica a la irradiació amb làser de díode de 655 nm d'emissió*



## DISCUSSIÓ



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DÍODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES

Marc-Ignasi Corral-Baqués

ISBN/ DL:T.1240-201

*Resposta de la motilitat espermàtica a la irradiació amb làser de díode de 655 nm d'emissió*

## 5. DISCUSSIÓ

Aquesta recerca s'ha estructurat en diferents sèries experimentals dirigides a analitzar els principals aspectes que poden estar relacionats amb l'efecte de la irradiació amb llum làser de l'esperma caní. La discussió comença explicant el plantejament experimental realitzat, analitza per separat els resultats de les sèries experimentals, continua amb l'anàlisi de les troballes referents a les subpoblacions espermàtiques, segueix amb una valoració global dels resultats per acabar amb les possibilitats d'una futura recerca.

### 5.1. Plantejament i estructuració de la recerca

L'estudi de l'efecte que té una determinada longitud d'ona d'una REM sobre un teixit biològic és molt complex; per una banda, no es pot marcar el fotó i seguir-lo i, per l'altra, pot actuar a nivells molt diferents, que són difícils d'individualitzar i de seguir separatament. Si es considera que la diana és la cèl·lula, el millor sistema és aïllar una cèl·lula per estudiar el seu comportament sota la dita radiació. En aquest sentit l'esperma té uns avantatges, malgrat que forma part d'un sistema viu, fisiològicament es tracta d'una cèl·lula individual, i forma part de la seva maduresa, viure i actuar fora de l'organisme que l'ha generat, alterant-se molt menys la seva fisiologia que no pas qualsevol altra cèl·lula o teixit del cos mantingut *ex vivo*, que creix, es divideix i mor. També, per a la seva funció biològica, la motilitat li és una característica fonamental que està molt objectivada per la recerca científica.

Per veure com la irradiació amb un làser de díode de 655 nm d'emissió contínua amb una potència de sortida variable de 5 mW fins a 53 mW, amb un *spot* de 0.56 cm de diàmetre influencia la motilitat de l'esperma caní d'ejaculats, fisiològicament normals, es començà cercant els precedents en la literatura científica, necessaris per poder dissenyar les diferents sèries experimentals.

Es decidí, en la SE1, exposar les mostres a dosis compreses en el rang de l'estudi de Marín i Vélez (1990).

En la SE2, per trobar el rang de dosis amb efectes biològics, se cercaren el límits superior i inferior d'acció del làser. També s'estudià si el semen s'estructurava en subpoblacions i si aquestes es mantenien en les mostres irradiades.

En la SE3 s'intentà veure si l'acció làser està relacionada amb la fosforilació de la tirosina, ja que d'entre les seves accions biològiques hi ha la regulació de la motilitat espermàtica. S'usà com a dosi d'estudi la que mostrà més diferències respecte del control en la SE1:  $6 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $E_T = 3.34 \text{ J}$ ); aquesta dosi mantenia les característiques mòtils inicials del semen al cap de 45 minuts, característiques que el control no mantenia, i fou l'única que presentà una diferència estadísticament significativa amb el HOST.

En la parametrització làser, no sols la dosi és rellevant, sinó també altres paràmetres com ara la potència d'emissió làser (Azevedo i col·l., 2006; Ilic i col·l., 2006; Lanzafame i col·l., 2007; Tunér i Hode, 2002*b*; Vélez i col·l., 2008*b*). És sabut que per obtenir certs efectes de la irradiació làser, el temps d'exposició, o més ben dit, el temps durant el qual s'ha d'anar alliberant l'energia necessària és important, ja que hi ha d'haver un temps biològic perquè la cèl·lula processi l'energia procedent de la radiació electromagnètica. Això ha estat abastament estudiat en la PDT (Dougherty i col·l., 1979), on la presència d'oxigen és necessària per a la producció d'oxigen singlet ( $^1\text{O}_2$ ) i això representa un temps fisiològic de reacció. Per aquest motiu es va dissenyar la SE4, per tal d'esbrinar si l'alliberament d'una mateixa energia a diferents temps dona diferents efectes, que de demostrar-se, indicaria que els mecanismes d'acció podrien estar involucrats en reaccions metabòliques dependents de metabòlits intermediaris. En la SE4 es treballà novament amb la dosi que s'havia considerat que mostrava un major efecte, en la SE1 ( $E_T = 3.34 \text{ J}$ ).

Finalment, en la SE5, sabent que les ROS es produeixen principalment al mitocondri (Agarwal i col·l., 2005), es cercà si les mROS juguen un paper rellevant en el mecanisme d'acció del làser sobre l'espermatozoide. En aquesta SE s'irradià amb la dosi base de la SE3 i SE4, i amb les dues potències que mostraren major divergència entre aquestes en la SE4: la P7 (6.8 mW), perquè fou la que mantingué les característiques mòtils de l'esperma, respecte del control al temps 0, als 45 minuts i P50 (49.7 mW), perquè fou la que mostrà un major nombre de diferències significatives ( $p < 0.05$ ) respecte del control, tant justament després de ser irradiat com als 45 minuts.

La SE1, a més d'exposar les mostres a diferents dosis, també serví per establir a quins temps era rellevant prendre les imatges CASA; inicialment es féu als temps: 0 (control), 00 (just després d'irradiar), 15 i 45 minuts. Els resultats conclogueren que

les dades als 15 minuts no eren rellevants; per tant, en les SE2 i SE4 sols es tingueren en compte els temps: 0 (control), 00 (just després d'irradiar) i 45 minuts.

Els paràmetres de motilitat estudiats en la SE1 només es corresponen, en part, amb els estudiats en les altres sèries experimentals, ja que l'anàlisi es féu amb un programari CASA més antic i el nou programari proporcionava menys paràmetres, però suficients per donar una informació més acurada de les característiques mòtils seminals.

## 5.2. Anàlisi dels resultats per sèries experimentals

### Dosi d'estimulació espermàtica (SE1)

En aquesta SE es veié que el moviment dels espermatozoides irradiats, als 45 minuts, és més recte que el del control, això indicaria un moviment espermàtic més efectiu i energèticament més eficient per arribar més lluny.

El HOST mostrà canvis significatius per a les dosis de  $4 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  i  $6 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ , mentre que el control i  $10 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  no, aquest resultat indicaria que el làser també millora la qualitat funcional; aquest fet és rellevant, ja que s'ha comprovat una correlació positiva entre el xoc hipoosmòtic i la fertilitat en el porc, tant in vivo (Pérez-Llano i col., 2001; Yeste, 2008b) com in vitro (Gadea, 2005). Això es podria correlacionar, també, amb una millora de la capacitat fecundant d'aquest semen.

Encara que no significativa ( $p = 0.052$ ), en aquesta SE s'ha vist una disminució més marcada de la formació de L-lactat a la dosi  $6 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ , que correspon a la dosi de màxims canvis significatius ( $p < 0.05$ ) respecte del control. Aquest resultat és més difícil d'explicar, principalment per la peculiaritat del metabolisme energètic de l'esperma caní, on les vies anabòliques i catabòliques s'entrecreuen (Rigau i col·l., 2002). Es podria especular que la disminució (no significativa) de la producció de L-lactat estaria relacionada amb el canvi del patró mòtil dels espermatozoides. Segons diferents autors, l'energia làser és absorbida a nivell del mitocondri (Karu, 1998; Gao i Xing, 2009; Silveira i col·l., 2009; Tafur, 2010), principalment a nivell del citocrom C. En els precedents bibliogràfics d'irradiació espermàtica amb làser hi ha els estudis de Sato i col·l. (1984) i Lenzi i col·l. (1989) amb esperma humà, el de Marín i Vélez (1990) amb toro, Iaffaldano i col·l. (2005) amb paó, Zan-Bar i col·l. (2005) amb marrà i tilàpia, i Iaffaldano i col·l. (2010) amb conill; no s'han identificat estudis amb

esperma caní. La comparació d'aquests resultats amb els estudis citats no és possible per diferents raons:

- Tots ells treballaren amb esperma d'altres espècies.
- Els estudis de Sato, i Marín i Vélez no especifiquen la potència d'emissió.
- Els paràmetres estudiats no han estat els mateixos.
- Zan-Bar i col·l. treballaren amb diferents longituds d'ona.

Malgrat aquestes diferències, es pot dir que per acció de la llum vermella, en general, la motilitat es veié augmentada en l'esperma d'home, toro, tilàpia i marrà, i que el rang de major efecte es donà entre 4-32 J·cm<sup>-2</sup>. I tant Marín i Vélez (1990) com Iaffaldano i col·l. (2010) trobaren que la dosi que mostrà un major efecte fou la de 6 J·cm<sup>-2</sup>.

En aquesta primera SE allò més rellevant fou que els paràmetres de motilitat espermàtica, VAP, LIN i BCF del grup control disminuïren significativament ( $p < 0.05$ ) al llarg del temps (45 minuts), mentre que els grups irradiats mantingueren els valors inicials. Això vol dir que l'esperma irradiat mantenia les seves característiques mòtils més enllà que el control. Com en el cas de Marín i Vélez (1990), i Iaffaldano i col·l. (2005), la supervivència espermàtica no disminuï respecte del control, tot i que per a Iaffaldano i col·l. (2005) aquesta augmentà.

### **Rang d'afectació espermàtica per làser (SE2)**

Aquesta SE permet confirmar l'existència de canvis en la motilitat tot i utilitzar dosis menors o majors que en la SE1. Aquests canvis són dosi dependent, i cal remarcar la influència de la dosi més alta 16 J·cm<sup>-2</sup> ( $E_T = 8.8$  J) sobre l'estructura subpoblacional. Aquests resultats, per la seva peculiaritat, són analitzats en profunditat en l'apartat Anàlisi de l'estudi subpoblacional d'aquesta discussió.

El HOST no donà canvis significatius. Això està en consonància amb els resultats de la SE1, ja que les dosis irradiades, superiors a 10 J·cm<sup>-2</sup> i inferiors a 4 J·cm<sup>-2</sup>, s'allunyaven de les dosis que mostraren els canvis significatius ( $p = 0.052$ ) a la SE1.

### **Determinació de la tirosina fosforilada (SE3)**

Els resultats d'aquesta SE indiquen que no hi ha canvis de la tirosina fosforilada. Això es pot deure a diferents raons. Primera, que la longitud d'ona estudiada no utilitza aquest mecanisme d'acció. Segona, que la tirosina és responsable de la

regulació de la motilitat espermàtica i intervé en els processos metabòlics que acaben desembocant en els fenòmens de la capacitació, en ser la dosi estudiada aquella que mantenia les característiques de la motilitat espermàtica inicial al llarg del temps, no pogué, per definició, mostrar canvis de la tirosina fosforilada encara que aquesta fos el mecanisme d'acció. Tercera, que els nivells de tirosina fosforilada siguin insignificants i, per tant, no detectables.

Aquests resultats no es poden discutir en el marc de la recerca científica, ja que no s'han trobat en la literatura altres recerques que l'hagin estudiada en el context de la biomodulació espermàtica per làser.

### Determinació de la influència de la potència d'emissió (SE4)

Els resultats permeten confirmar objectivament que la potència és important per veure efectes de la radiació làser. La rellevància d'aquest paràmetre dosimètric ha estat estudiat en altres cèl·lules, però no pas amb els espermatozoides, no fent possible comparar aquests resultats amb la literatura científica actual. Com major és la potència d'un làser, major és el camp electromagnètic que el seu feix genera. Amat i col·l. (2006) proposaren que un possible mecanisme d'acció de la irradiació làser, diferent de l'absorció, es basaria en la pèrdua de l'energia cinètica que experimenta el camp electromagnètic en creuar un medi. D'aquesta manera, en la SE4, un major camp electromagnètic hauria estat el responsable d'induir el major nombre de canvis significatius ( $p < 0.05$ ) si es compara amb P0 (taula 37).

	P0	P7	P15	P33	P50
VCL					
VSL					
VAP					
LIN					
STR					
WOB					
ALHmed					
BCF					
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>7</b>

**Taula 37.** Relació dels diferents paràmetres mòtils que es veieren afectats significativament ( $p < 0.05$ ) als 45 minuts, segons cada potència d'emissió (P0 = control, P7 = 6.8 mW, P15 = 15.4 mW, P33 = 33.1 mW i P50 = 49.7 mW) en ser irradiats amb 3.34 J de  $E_T$ . Es remarquen en vermell els paràmetres que augmentaren i en verd els que disminuïren. A la part inferior hi ha la suma del nombre de paràmetres alterats.

Aquesta SE dona una visió global de l'acció làser, segons alguns dels seus paràmetres dosimètrics a partir de la dosi més efectiva ( $E_T = 3.34$  J) trobada en aquesta recerca, i com aquesta es pot modular en funció de la potència d'emissió.

La P50 (49.7 mW) és la potència que ha donat un major nombre de canvis significatius ( $p < 0.05$ ) (taula 37), gairebé en la totalitat dels paràmetres mòtils estudiats, mentre que la P7 (6.8 mW) seria la que permetria mantenir les característiques mòtils inicials del semen als 45 minuts posteriors a l'obtenció de la mostra, característiques que el mateix control no manté. Sabent que la capacitació espermàtica implica una sèrie de canvis de la motilitat espermàtica, activant els espermatozoides, sembla que la P50 seria la que podria apropar-se més a aquesta situació fisiològica, però s'hauria de comprovar en futures recerques.

Tant el HOST com el L-lactat han estat negatius per a totes les potències d'emissió, fins i tot per a la P33 (33.1 mW) que és la corresponent a la de la SE1 (38.75 mW); seria d'esperar que, si més no, en aquesta potència s'haguessin repetit els resultats de la SE1. A causa de la variabilitat que hi ha entre ejaculats d'un mateix animal i entre individus, és impossible obtenir ejaculats idèntics entre aquests; per tant, aquests no són predictibles i hi intervenen elements com ara diferents estats de maduració dels diferents espermatozoides que integren un mateix ejaculat, i fa que el seu comportament pugui ser diferent.

### **Determinació d'espècies reactives d'oxigen (SE5)**

Molts estudis conclouen que la biomodulació per làser o llum, de diferents cèl·lules o teixits biològics, es produeix mitjançant les ROS (Friedmann i col·l., 1991; Lubart i col·l., 1992b; Karu, 1999; Fujimaki i col·l., 2003; Lavi i col·l., 2003; Lubart, 2005; Mohanty i col·l., 2006; Rizzi i col·l., 2006; Lubart i col·l., 2006; Lindgård i col·l., 2007; Tafur i col·l., 2008; Zhang i col·l., 2008; Wu i col·l., 2009) i l'espermatozoide no n'hauria de ser una excepció. Cohen i col·l. (1998) trobaren que l'efecte de la irradiació d'esperma de ratolí amb un làser de HeNe es produeix mitjançant la generació de  $H_2O_2$ ; Zan-Bar i col·l. (2005) varen observar un increment de la motilitat i la fertilitat de l'esperma de tilàpia en usar llum vermella i blanca, mentre que la motilitat i la fertilitat de l'esperma de marrà sols augmentà lleugerament per la irradiació amb llum vermella; també trobaren que les ROS produïdes per la inducció lumínica en l'esperma de tilàpia era més alta que en el marrà, la qual cosa podria explicar llur diferents respostes a diferents fonts lumíniques. D'aquí la dificultat d'analitzar els resultats negatius de la SE5. Aparentment un resultat negatiu de les mROS les descartaria com a mecanisme d'acció, però en el moment de la redacció d'aquesta discussió s'acaba d'acceptar la publicació d'un article que tracta aquesta

problemàtica. Ramió-Lluch i col·l. (2010), estudiant els canvis específics de l'activitat mitocondrial, que regulen la generació de les ROS, en la capacitació i en la reacció acrosòmica de l'esperma porcí, han trobat que l'anàlisi de la mitjana de l'activitat mitocondrial no mostra canvis. Però una aproximació analítica subpoblacional ha mostrat ser molt més sensible per detectar canvis significatius ( $p < 0.05$ ). Davant aquest nou plantejament analític, els presents resultats no permeten descartar la implicació de les mROS en el mecanisme d'acció del làser en l'esperma caní. Això remet a la possible major importància o rellevància biològica de les subpoblacions espermàtiques. De totes maneres no es pot descartar que altres tipus de ROS puguin ser-ne els responsables.

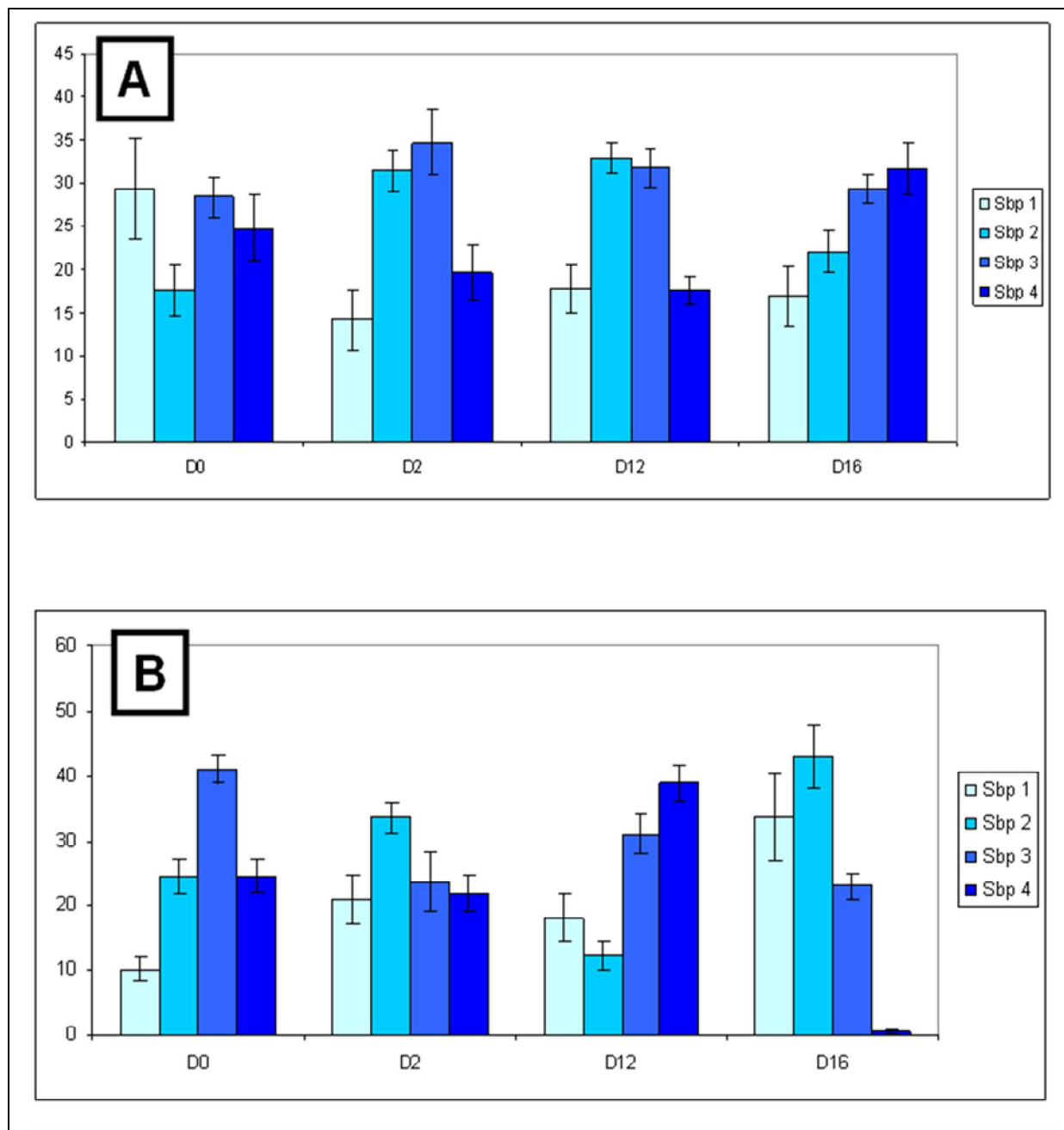
### 5.3. Anàlisi de l'estudi subpoblacional

L'existència de quatre subpoblacions espermàtiques mòtils que coexisteixen en els ejaculats canins trobades en la SE2 i la SE4, tant en les mostres control com en les irradiades, és una característica similar a les ja ressenyades en altres espècies de mamífers com el verro (Abaigar i col·l., 1999; Quintero-Moreno i col·l., 2003; Quintero-Moreno i col·l., 2004; Rivera i col·l., 2005), la gasela (Abaigar i col·l., 1999), el cavall (Quintero-Moreno i col·l., 2003), l'ase (Miró i col·l., 2005) i el conill (Quintero-Moreno i col·l. 2007). Però les troballes de la present recerca contradiuen dos estudis previs del mateix grup de recerca, Martínez i col·l. (2006) que trobaren sis subpoblacions diferents, mentre que Núñez-Martínez i col·l. (2006) trobaren 11 subpoblacions diferents en esperma fresc de gos i 9 en les mostres de semen congelat i descongelat. El càlcul estadístic per al qual arribaren a la divisió subpoblacional és diferent al que s'ha usat en la present recerca; a més, les subpoblacionals mostraven massa solapament entre aquestes (tenint en compte les desviacions estàndard); això explicaria les diferències entre aquests estudis i aquesta recerca, així com la troballa de quatre Sbp en altres espècies, i cal remarcar com és d'important l'anàlisi estadística específica usada en els estudis de subpoblacions espermàtiques.

L'única situació en la qual s'ha vist un comportament diferent, concretament una reestructuració, ha estat en la SE2, amb la dosi de  $16 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $E_T = 8.8 \text{ J}$ ) (gràfic 3). És sabut que dosis altes poden tenir un efecte de bloqueig metabòlic (Hourelid i Abrahamse, 2007). En la present recerca s'ha observat una desestructuració de les subpoblacions, amb la pràctica desaparició de la Sbp 4 al temps de 45 minuts,



passant del  $31,7 \pm 3,0$  % al  $0,53 \pm 0,3$  % de forma estadísticament significativa ( $p < 0,05$ ), i un gran solapament entre les diferents subpoblacions. Aquesta desaparició de la Sbp 4



**Gràfic 3.** Percentatge de les subpoblacions del semen no irradiat (D0) i els irradiats D2, D12 i D16 irradiats amb 2, 12 i 16 J·cm<sup>-2</sup>, respectivament. El gràfic A correspon a la distribució subpoblacional al temps 0 (just després d'irradiar) i el gràfic B, als 45 minuts postirradiació. Els resultats s'expressen en forma de mitjanes ± SEM.

no es correspon a una mort dels espermatozoides més ràpids, sinó al seu alentiment. Cal valorar la transcendència d'aquest canvi estructural que passa de

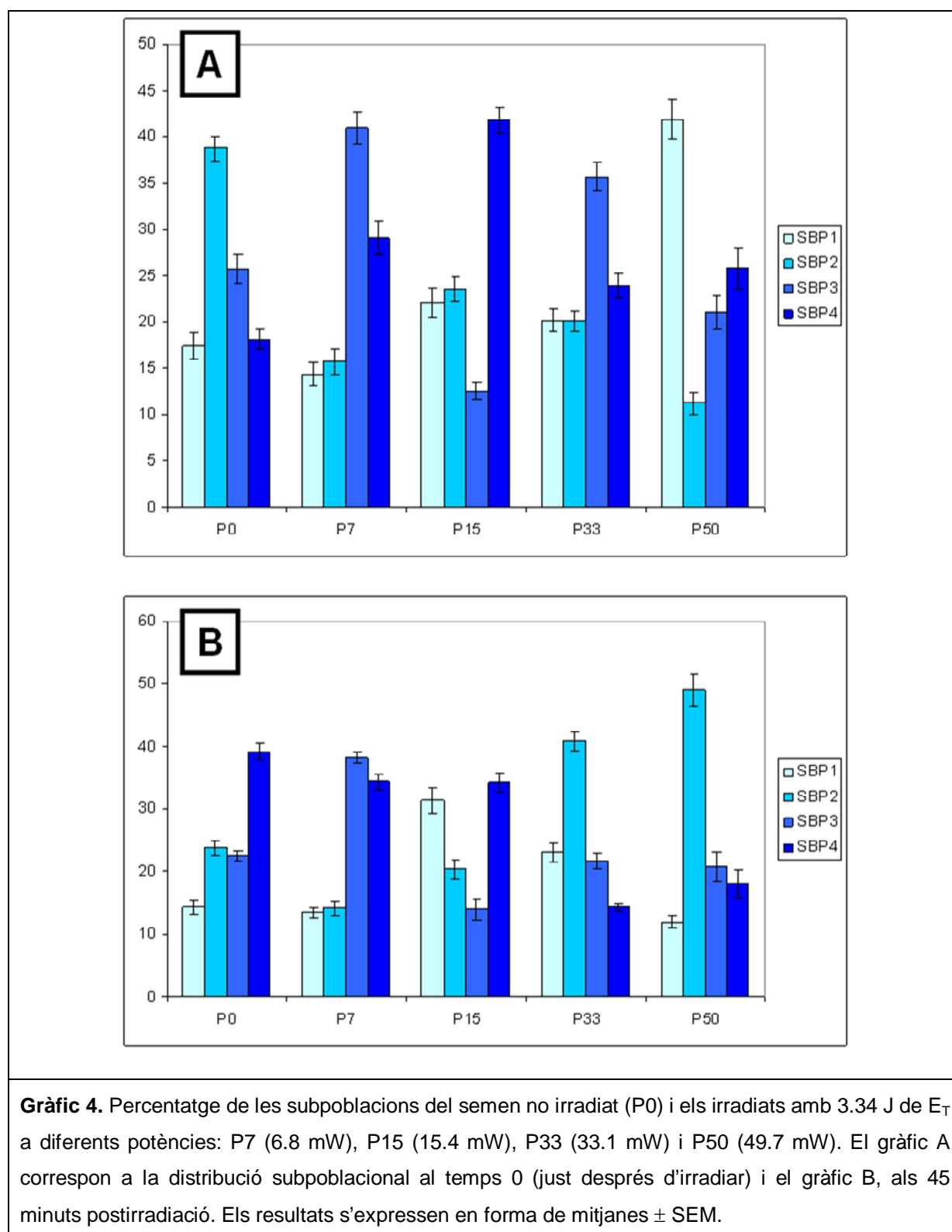
quatre Sbp a tres Sbp. Quintero-Moreno i col·l. (2003) que havien identificat quatre Sbp en l'esperma equí, trobaren que els ejaculats dels cavalls que havien provat la seva fertilitat no mostraven la Sbp 4 i que els resultats semblaven indicar que la fertilitat és associada als espermatozoides inclosos en la Sbp 1. Aquesta troballa dóna peu a dos camins de recerca: d'una part, utilitzar la capacitat reestructurant de la radiació làser a 8.8 J d'energia total per estudiar la importància de les subpoblacions i, d'una altra, estudiar si la desaparició de la Sbp 4 en l'esperma caní influeix en la seva capacitat fecundant.

També és interessant parlar d'esment en el comportament de les subpoblacions de la SE4. Ja en l'anàlisi particular de la dita SE s'havia remarcat que, als 45 minuts posteriors a la irradiació, hi havia dues potències amb respostes oposades, la menor potència P7 (6.8 mW) que no mostrava canvis respecte del control al temps 0, i la P50 (49.7 mW) que era la que mostrava més canvis, i s'obria així l'interrogant de quina de les dues podria representar un augment de la capacitat fecundant d'un ejaculat. Però en analitzar la distribució subpoblacional de la P50 als 45 minuts postirradiació i comparar-la amb el control al temps 0, encara que amb diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre algunes de les Sbp (taula 36), la distribució general era similar (gràfic 4), amb un predomini de la Sbp 2, seguint de forma decreixent la Sbp 3, la Sbp 4 i la Sbp1, respectivament. Ja en la discussió dels resultats de la SE5, s'ha assenyalat, arran de les troballes de Ramió-Lluc i col·l. (2010), la importància d'estudiar en major profunditat les subpoblacions com un element rellevant en la funcionalitat espermàtica, de manera que els canvis espermàtics mitjans puguin ser menys rellevants que els canvis a nivell subpoblacional.

#### **5.4. Anàlisi conjunta dels resultats**

En cap cas de la present recerca, la irradiació làser ha donat lloc a alteracions morfològiques ni ha alterat la qualitat seminal.

En la comparació de dades s'han trobat inconsistències, especialment en comparar els controls de la SE2 i la SE4 (els resultats de la SE1 no es poden comparar, ja que el programari CASA utilitzat és d'una versió més antiga que l'emprat a les altres dues sèries experimentals i els paràmetres estudiats en la SE1 no són exactament



els mateixos que en els altres dos). Aquestes inconsistències (taula 38) radiquen en els canvis estadísticament significatius ( $p < 0.05$ ) observats en comparar els diferents controls als 45 minuts, i es veu que no s'havien comportat de la mateixa manera. Si s'analitzen aquestes diferències en els diferents paràmetres estudiats

percentualment, és a dir, si es mira en quin percentatge augmenta o disminueix un paràmetre, en general s'han vist canvis percentuals petits, o sigui que l'augment de la velocitat en un 3 % no pot ser un canvi que pugui implicar una rellevància biològica. Aquestes discordances poden ser degudes a diferents circumstàncies: en funció del gos (gos dependent) i/o pel sistema CASA (CASA dependent).

**Gos dependent.** Hi ha espècies animals en què no és possible predir les característiques mòtils de l'ejaculat, com s'ha comprovat en el cas del porc (Quintero i col·l., 2004). El resultat de la present recerca indica que en el gos tampoc és predictable, això justificaria que els valors mitjans dels paràmetres inicials dels ejaculats siguin diferents.

	SE	Resultat		dif. %
		0	45 min	
<b>VAP</b> ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )	<b>SE1</b>	53.9	19.8*	-36.7 %
	<b>SE2</b>	92.5	102.1*	10.4
	<b>SE4</b>	90.5	87.2*	-3.8
<b>LIN</b> (%)	<b>SE1</b>	54.5	20.8*	-38.2
	<b>SE2</b>	54.4	50.3	-7.5
	<b>SE4</b>	63.2	63.8	0.9
<b>ALH med</b> ( $\mu\text{m}$ )	<b>SE1</b>	2.8	1.5	-46.4
	<b>SE2</b>	5.9	6.6*	+11.9
	<b>SE4</b>	4.1	4.3	2.4
<b>BCF</b> (Hz)	<b>SE1</b>	14.0	8.2*	-41.4
	<b>SE2</b>	10.1	9.2	-8.9
	<b>SE4</b>	10.2	10.7	7.0
<b>STR</b> (%)	<b>SE1</b>			
	<b>SE2</b>	77.7	81.1	4.4
	<b>SE4</b>	85.2	88.0*	3.3
<b>VCL</b> ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )	<b>SE1</b>			
	<b>SE2</b>	146.5	167.2*	14.1
	<b>SE4</b>	123.8	124.1	0.2

**Taula 38.** Comparativa dels controls de les diferents sèries experimentals (SE), s'han senyalat amb un asterisc els canvis significatius respecte del control al temps 0, a la columna "dif. %" s'hi mostren les diferències percentuals entre el valor inicial i el valor als 45 minuts.

Encara que les condicions nutricionals, sanitàries i mediambientals hagin estat les mateixes, cal no oblidar factors de variabilitat interespècie, com la genètica i l'edat, que justifiqui aquestes diferències.

Les diferents SE no s'han realitzat a la mateixa època de l'any. Altres autors com Taha i col·l. (1981) trobaren variacions de concentració, volum i concentracions de la glicerolfosforilcolina en els ejaculats de gos amb relació a l'estació de l'any, amb valors superiors al març, abril, maig i juny, per contra no trobaren canvis en la motilitat ni en la concentració de la testosterona plasmàtica. Els mètodes de mesura de la motilitat han millorat molt darrerament i no es pot descartar que amb mesures més acurades es poguessin trobar variacions estacionals que poguessin afectar tant la motilitat com les subpoblacions i justificar aquestes troballes.

**CASA dependent.** Com ja s'ha esmentat anteriorment, el programari del sistema CASA emprat en la primera SE va ser substituït per una versió més actualitzada. La principal diferència entre ambdues versions és el nombre d'imatges capturades per segon, 16 en la primera versió i 25 en la següent. Un major nombre d'imatges per segon permet millorar el coneixement de la trajectòria real de cada espermatozoide. Aquest canvi no permet comparar els resultats de la SE1 amb els de la SE2 i SE4.

El programari més modern emprat no permet retallar porcions finals o inicials de la trajectòria d'un espermatozoide. A voltes hi ha espermatozoides que trobaven a l'inici o al final del seu desplaçament alguna interferència, com xocs amb altres espermatozoides, que alterava el valor mitjà dels seus diferents paràmetres mòtils, i desvirtuava així la qualitat real de la seva motilitat. Això influïa en el procés de neteja d'imatges i la decisió d'acceptar o no certes trajectòries. En algun cas aïllat es detectà que el programari donava trajectòries falses en construir les trajectòries de dos espermatozoides que es creuaven, com si la continuació de la trajectòria fos la que realitzava l'altre espermatozoide que s'havia creuat en la trajectòria (però amb el qual no havia xocat ni interferit), i no permetia reconstruir les dues trajectòries per separat i, per tant, no es podien incloure en l'estudi.

Cal remarcar que l'extrapolació dels resultats obtinguts en la present recerca amb esperma caní, difícilment és aplicable a l'esperma d'altres mamífers a causa de la gran variabilitat morfològica i fisiològica que aquest experimenta entre espècies. Així mateix, els resultats obtinguts amb el làser de 655 nm de longitud d'ona no són, en cap cas, extrapolables a altres longituds d'ona, ja que sabem que la resposta biològica és longitud d'ona dependent a iguals condicions dosimètriques (Tunér i Hode, 2002b). Cal destacar, també, que com més estressada està una cèl·lula, major és la seva resposta a la irradiació làser: "It is reasonable to conclude that some of the contradictory results reported in the literature actually stem from the fact that the above parameters (tissue and cell condition) have not been considered"<sup>11</sup> (Tunér i Hode, 2002b). En aquesta recerca s'ha estat treballant amb cèl·lules sanes i en condicions biològicament òptimes; per tant, els canvis biològics observats són dins els límits fisiològics d'una cèl·lula sana i no estarien pas en contradicció amb el fet que els efectes de l'LPT són més marcats en irradiar cèl·lules o teixits en estrès.

## 5.5. Futura recerca

Aquesta tesi obre la porta a noves recerques:

- Cercar límits en el temps, fins quan després de l'obtenció de la mostra, el semen continua responent a la irradiació.
- Una altra via a investigar són els òxids de nitrogen (NOs), que han estat identificats com a agents importants en els espermatozoides pel seu paper en processos com ara la reacció acrosomal i la capacitació. La irradiació d'esperma boví amb làser visible augmenta la concentració de NOs, variant els efectes segons la longitud d'ona; així el color blau s'ha vist més efectiu que el vermell, en millorar la capacitat de fecundació in vitro, en condicions d'estrès simulat i en medi PBS amb absència de calci i magnesi (Ankri i col·l., 2010).
- En la SE2 s'ha vist que la dosi màxima irradiada,  $16 \text{ J/cm}^2$  ( $E_T = 8.8 \text{ J}$ ), té efectes completament diferents als observats amb les altres dosis, especialment a nivell de les subpoblacions que les desestructura. Es podrien aprofitar aquesta capacitat de desestructuració com a mètode per a l'estudi de la importància de les subpoblacions espermàtiques. Flores i col·l. (2009) veieren que les estructures

---

<sup>1</sup> És raonable concloure que alguns dels resultats contradictoris publicats resulten del fet que els paràmetres anteriorment citats (condicions cel·lulars i tissulars) no s'han tingut en compte.

subpoblacionals eren diferents entre els espermatozoides que congelaven bé i els que no congelaven bé, de manera que podríem alterar artificialment l'estructura subpoblacional d'un ejaculat per poder estudiar més acuradament el seu comportament en el procés de congelació. També caldria veure la importància de característiques com ara la motilitat o les subpoblacions en la capacitat fecundant d'un mateix ejaculat, en especial la transcendència de la Sbp 4.

- Dels resultats de la SE4 (diferents potències d'emissió) caldria veure quina de les dues potències que han mostrat una major diferència entre aquestes: 6.8 mW o la de 49.7 mW té una major rellevància en la capacitat fecundant d'un ejaculat.
- Estudis, tant clínics com experimentals, han objectivat que l'LPT té els seus efectes més importants en cèl·lules, teixits i òrgans que estan afectats per un deteriorament generalitzat (Tunér i Hode, 2002b) i encara no sabem com respondria l'esperma estressat o de baixa qualitat a la irradiació làser. Manipulacions com la centrifugació i la congelació de l'esperma són una pràctica habitual en els laboratoris de reproducció, caldria veure quins són els efectes de la irradiació abans o després de ser estressats (centrifugació i/o congelació) i veure com reaccionen o es recuperen de la fase d'estrès. Mirant que en aquests casos, si són positius, el mecanisme de la tirosina fosforilada o de les ROS (tenint en compte el mètode d'anàlisi subpoblacional) pugui ser rellevant.
- Estudiar els efectes de la irradiació làser en el semen d'altres espècies animals.
- Caldria veure com influencia la irradiació directa en l'esperma o en els testicles de gossos amb una baixa qualitat seminal, ja sigui en nombre d'espermatozoides com en motilitat disminuïda o percentatge alt d'anomalies morfològiques, per citar algunes situacions.
- Cal descartar qualsevol efecte teratogènic de la irradiació espermàtica.
- Qualsevol dels casos anteriors s'hauria d'estudiar amb diferents longituds d'ona, així com altres fonts de llum com els díodes d'emissió lumínica (LED) d'alta potència, ja que els resultats obtinguts no són extrapolables perquè els cromòfors i els nivells d'acció poden ser diferents.



## CONCLUSIONS



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DíODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES

Marc-Ignasi Corral-Baqués

ISBN/ DL:T.1240-201

*Resposta de la motilitat espermàtica a la irradiació amb làser de díode de 655 nm d'emissió*

## 6. CONCLUSIONS

La present recerca sobre la irradiació dels espermatozoides d'ejaculats, fisiològicament normals, de gossos sans, amb un làser de díode de 655 nm d'emissió contínua amb una potència de sortida variable de 5 mW fins a 53 mW, amb un *spot* de 0.56 cm de diàmetre permet afirmar que:

1. Els espermatozoides responen a l'energia làser.
2. La resposta de l'esperma a la irradiació làser és dosi i potència dependent.
3. La irradiació làser mostra un rang d'acció, amb un límit superior i inferior, que és dosi i potència dependent.
4. La distribució percentual i la motilitat de les subpoblacions espermàtiques també es veuen afectades per la radiació làser i són tant dosi com potència dependents.
5. L'acció làser sobre l'esperma no està relacionada amb la fosforilació de la tirosina.
6. Els valors mitjans de les espècies reactives d'oxigen mitocondrial (mROS) en l'esperma de gos no mostren canvis significatius.
7. Les característiques mòtils de l'ejaculat caní no són estadísticament predictibles.

De manera general, es conclou que la motilitat de l'esperma caní, així com la motilitat i la distribució percentual de les subpoblacions espermàtiques, responen a la irradiació làser, i ho fan diferentment en funció de la dosi i la potència d'emissió, no estant l'acció làser relacionada amb la fosforilació de la tirosina.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DÍODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES

Marc-Ignasi Corral-Baqués

ISBN/ DL:T.1240-201

*Resposta de la motilitat espermàtica a la irradiació amb làser de díode de 655 nm d'emissió*



## **BIBLIOGRAFIA**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DÍODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES

Marc-Ignasi Corral-Baqués

ISBN/ DL:T.1240-201

*Resposta de la motilitat espermàtica a la irradiació amb làser de díode de 655 nm d'emissió*

## 7. BIBLIOGRAFIA

Abaigar T, Holt WV, Harrison RAP, del Barrio G. Sperm Subpopulations in Boar (*Sus scrofa*) and Gazelle (*Gazella dama mhorr*) Semen as Revealed by Pattern Analysis of Computer-Assisted Motility Assessments. *Biology of Reproduction*. 1999; 60: 32-41.

Abergel RP, Meeker CA, Lam TS, Dwyer RM, Lesavoy MA, Uitto J. Control of connective tissue metabolism by lasers. recent developments and future prospects. *J Am Acad Dermatol*. 1984; 11: 1142-1150.

Agar NS, Halliday GM, Barnetson RS, Ananthaswamy HN, Wheeler M, Jones AM. The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101 (14): 4954-4959.

Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J Androl*. 2005; 26 (6): 654-660.

Agca SA, Gilmore J, Byers M, Woods EJ, Liu J, Critser JK. Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars. *Biol Reprod*. 2002; 67: 1493-1501.

Aitken RJ, Buckingham DW, Harkiss D, Paterson M, Fisher H, Irvine DS. The extragenomic action of progesterone on human spermatozoa is influenced by redox regulated changes in tyrosine phosphorylation during capacitation. *Mol Cell Endocrinol*. 1996; 117: 83-93.

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; 59: 1037-1046.

Albarracin JL, Mogas T, Palomo MJ, Peña A, Rigau T, Rodríguez-Gil. *In vitro* capacitation and acrosome reaction of dog spermatozoa can be feasibly attained in a defined medium without glucose. *Reprod Dom Anim.* 2004; 39: 1-7.

Almeida-Lopes L, Rigau J, Amaro Zângaro R, Guidugli Neto J, Martins Marques Jaeger M. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med.* 2001; 29: 179-184.

Amat, A. Effect of visible and near-infrared light on adenosine triphosphate (ATP). [Tesi doctoral]. Reus (Tarragona): Universitat Rovira i Virgili. 2005.

Amat A, Rigau J, Waynant RW, Ilev IK, Tomas J, Anders JJ. Modification of the intrinsic fluorescence and the biochemical behavior of ATP after irradiation with visible and near-infrared laser light. *J Photochem Photobiol B.* 2005; 81 (1): 26-32.

Amat A, Rigau J, Waynant RW, Ilev IK, Anders JJ. The electric field induced by light can explain cellular responses to electromagnetic energy: a hypothesis of mechanism. *J Photochem Photobiol B.* 2006 ; 82 (2):152-60.

Ankri R, Friedmann H, Savion N, Kotev-Emeth S, Breitbart H, Lubart R. Visible light induces nitric oxide (NO) formation in sperm and endothelial cell. *Lasers Surg Med.* 2010; 42: 348-352.

Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJ, Sikka SC. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26: 869-880.

Azevedo LH, de Paula Eduardo F, Moreira MS, de Paula Eduardo C, Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth : a pilot study. *Lasers Med Sci.* 2006; 21 (2): 86-89.

Blaya DS, Guimarães MB, Pozza DH, Weber JB, de Oliveira MG. Histologic study of the effect of laser therapy on bone repair. J Contemp Dent Pract. 2008; 1; 9 (6): 41-48.

Bayat M, Vasheghani MM, Razavi N. Effect of low-level helium-neon laser therapy on the healing of third-degree burns in rats. J Photochem Photobiol B. 2006; 1; 83 (2): 87-93.

Born M, Wolf E. Electromagnetic potentials and polarization. En: Principles of optics: electromagnetic, theory of propagation, interference and diffraction of light. 6a ed. Cambridge: Pergamon Press, 1985, p. 71-108.

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248-256.

Braslavsky SE. Glossary of terms used in photochemistry 3<sup>rd</sup> edition. Pure Appl. Chem. 2007; 79 (3): 293-465.

Breitbart H, Levinshal T, Cohen N, Friedmann H, Lubart R. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membrane irradiated at 633 nm (HeNe laser). J Photochem Photobiol B. 1996; 34 (2-3): 117-21.

Bröcker B. Pimeros descubrimientos/Átomos y moléculas como constituyentes de la materia. En: Atlas de física atómica. Madrid: Alianza editorial, 1988, p. 10-15.

Brouwers JF, Silva PFN, Gadella BM. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. Theriogenology. 2005; 63: 458-469.

Brozyna A, Chwirot BW. Different susceptibility of cells of porcine skin and internal organs to ultraviolet A-induced breaking of nuclear DNA. Photochem Photobiol. 2005; 81 (3): 674-681.



Budworth PR; Amann RP; Chapman PL. Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *Journal of Antropology*. 1988; 9: 41-54.

Bulyakova NV, Azarova VS. Regeneration of skeletal muscles and state of thymus in gamma-irradiated rats under laser therapy of the area of muscle trauma. *Minim Invasive Ther Allied Technol*. 2006; 15 (5): 277-85.

Caiza de la Cueva FI, Rigau T, Miró J, Bonet S, Briz M, Rodríguez-Gil JE. Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: effects of ouabain. *Theriogenology*. 1997a; 47: 765-784.

Caiza de la Cueva FI, Pujol MR, Rigau T, Bonet S, Miró J, Briz M, Rodríguez-Gil JE. Resistance to osmotic stress of horse spermatozoa: the role of ionic pumps and the relationship to cryopreservation success. *Theriogenology*. 1997b; 48: 947-968.

Caiza de la Cueva FI, Rigau T, Pujol MR, Piedrafita J, Rodríguez-Gil JE. Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: the role of the ionic pumps and their relationship with cryosurvival. *An Rep Sci*. 1997c; 48: 301-315.

Caiza de la Cueva FI. Estudio sobre la resistencia al estrés osmótico de espermatozoides porcinos y equinos. [Tesi doctoral]. Bellaterra (Barcelona): Universitat Autònoma de Barcelona. 1998.

Cohen N, Lubart R, Rubinstein S, Breitbart H. Light irradiation of mouse spermatozoa: stimulation of in vitro fertilization and calcium signals. *Photochem Photobiol*. 1998; 68 (3): 407-13.

Corazza AV, Jorge J, Kurachi C, Bagnato VS. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. *Photomed Laser Surg*. 2007; 25 (2): 102-106.

Corral-Baqués MI, Rigau J. About time to get to speak the same language. Proc. 4th Congress of the World Association for Laser Therapy, Tokyo, Japan. 2002; p. 123. També a <[http://www.laser.nu/llt/llt\\_editorial10.htm](http://www.laser.nu/llt/llt_editorial10.htm)>.

Correa JR, Zavos PM. The Hypoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. Theriogenology. 1994; 42: 351-360.

Correa JR, Heersche G, Zavos PM. Sperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic swelling test incubation at varying temperatures. Theriogenology. 1997; 47 (3): 715-721.

Davies RO, Katz DF. Operational standards for CASA instruments. J Androl. 1993; 14: 385-394.

Davies RO, Siemers RJ. Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. Reprod Fertil Dev. 1995; 7: 857-869.

De Gruijl FR. Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol. 2002; 15 (5): 316-20.

De Jonge C. Biological basis for human capacitation. Hum Reprod Update. 2005; 11: 205-214.

De Lamirande E, O'Flaherty C. Sperm activation: Role of reactive oxygen species and kinases. Biochim Biophys Acta. 2008; 1784: 106-115.

Demidova-Rice TN, Salomatina EV, Yaroslavsky AN, Herman IM, Hamblin MR. Low-level light stimulates excisional wound healing in mice. Lasers Surg Med. 2007; 39 (9): 706-715.

Do Nascimento RX, Callera F. Low-level laser therapy at different energy densities (0.1-2.0 J/cm<sup>2</sup>) and its effects on the capacity of human long-term cryopreserved

peripheral blood progenitor cells for the growth of colony-forming units. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24 (5): 601-604.

Dougherty BW, Lawrence G, Kaufman JH, Boyle D, Weishaupt KR, goldfarb A. Photoradiation in the treatment of recurrent breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1979; 62: 231-237.

Dubé C, Leclerc P, Baba T, Reyes-Moreno C, Bailey J. The Proacrosin binding protein, sP152, is tyrosine phosphorylated during capacitation of pig sperm. *J Androl.* 2005; 26: 519-528.

Ebner T, Moser M, Yaman C, Sommergruber M, Tews G. Successful birth after laser assisted immobilization of spermatozoa before intracytoplasmatic injection. *Fertil. Steril.* 2002; 78 (2): 417-418.

Eddy EM. The spermatozoon. En: *The Physiology of Reproduction*. New York: E. Knobil and J. D. Neill (ed.) Raven Press, 1988, p. 27-68.

El sayed SO, Dyson M. Comparison of the effect of multiwavelength light produced by a cluster of semiconductor diodes and of each individual diode on mast cell number and degranulation in intact and injured skin. *Lasers in surg and Med.* 1990; 10: 559-568.

Ellington J, Scarlett J, Meyers-Wallen V, Mohammed HO, Surman V. Computer-Assisted Sperm Analysis of canine spermatozoa motility measurements. *Theriogenology.* 1993; 40: 725-733.

England GC, Plummer JM. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 1993; Suppl. 47: 261-270.

Feldman EC, Nelson RW. Evaluación clínica y diagnóstica del aparato reproductor del macho canino. En: *Endocrinología y reproducción canina y felina*. 3a ed. Buenos Aires: Editorial Inter-Médica, 2007, p. 1038-1064.

Feynman. The theory of gravitation. En: The Feynman lectures on physics. 6a impressió. Addison-Wesley Publishing Company; 1977. Vol. I 7-11.

Flores E, Fernandez-Novell JM, Peña A, Rodríguez-Gil JE. The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. Theriogenology. 2009; 72 (6): 784-797.

Friedmann H, Lubart R, Laulich I, Rochkind S. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. J Photochem Photobiol B. 1991; 11 (1): 87-91.

Friedmann h, Lubart R. Competition between activating and inhibitory processes in photobiology. Proc SPIE. 1995; 2630: 60-64.

Fujimaki Y, Shimoyama T, Liu Q, Umeda T, Nakaji S, Sugawara K. Low-level laser irradiation attenuates production of reactive oxygen species by human neutrophils. J Clin Laser Med Surg. 2003; 21 (3): 165-170.

Gadea J. 2005. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. Theriogenology. 2005; 63: 431-444.

Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. J Biomed Sci. 2009; 16: 4.

Gill HS, VanArsdalen K, Hypolite J, Levin, RM, Ruzich JV. Comparative study of two computerized semen motility analyzers. Andrologia. 1988; 20: 433-440.

Goldman L, Blaney DJ, Kindel DJ Jr, Richfield D, Franke EK. Pathology of the effect of the laser beam on the skin. Nature. 1963; 197: 912-914.

Grant SA, Long SE, Parkinson TJ. Fertilizability and structural properties of boar spermatozoa prepared by Percoll gradient centrifugation. Journal of Reproduction and Fertility. 1994; 100: 477-483.

Günzel-Apel AR, Günther C, Terhaer P, Bader H. Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa. J. Reprod. Fert. 1993; Suppl. 47: 271-278.

Hawkins D, Abrahamse H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. Photomed Laser Surg. 2006; 24 (6): 705-714.

Hillman H. The effect of visible light, sound, electric current, centrifugation and sodium ion on the terminal phosphate of ATP. Biochemical Journal. 1964; 93: 14.

Hillman H. 1996. "What price intellectual honesty?" asks a neurobiologist. En: Confronting the Experts. Brian Martin (editor), Albany: 99-130.

Holt WV, Watson P, Curry M, Holt C. Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different systems in a practical workshop. Fertil Steril. 1994; 62: 1277-1282.

Holt W. Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. Reprod Domest Anim. 1996; 31: 17-24.

Hourelid N, Abrahamse H. In vitro exposure of wounded diabetic fibroblast cells to a helium-neon laser at 5 and 16 J/cm<sup>2</sup>. Photomed Laser Surg. 2007; 25 (2): 78-84.

Hunter T. Signaling-2000 and beyond. Cell. 2000; 100 (1): 113-127.

Iaffaldano N, Meluzzi A, Manchisi A, Passarella S. Improvement of stored turkey semen quality as a result of He-Ne laser irradiation". Anim Reprod Sci. 2005; 85 (3-4): 317-325.

Iaffaldano N, Rosato MP, Paventi G, Pizzuto R, Gambacorta M, Manchisi A, Passarella S. The irradiation of rabbit sperm cells with He-Ne laser prevents their in vitro liquid storage dependent damage. Anim Reprod Sci. 2010; 119 (1-2): 123-129.

Iguer-Ouada M, Verstengen JP. Validation of the Sperm Quality Analyzer (SQA) for dog sperm analysis. *Theriogenology*. 2001a; 55: 1143-1158.

Iguer-Ouada M, Verstengen JP. Evaluation of the "Hamilton Thorn Computer-Base Automated System" for Dog Semen analysis. *Theriogenology*. 2001b; 55: 733-749.

Ilic S, Leichter S, Streeter J, Oron A, DeTaboada L, Oron U. Effects of power densities, continuous and pulse frequencies, and number of sessions of low-level laser therapy on intact rat brain. *Photomed Laser Surg*. 2006; 24 (4): 458-466.

Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Zaneveld LJ. The hypoosmotic swelling test: An update. *Arch Androl*. 1992; 39: 1279-1289.

Karu T. Primary and secondary mechanisms of the action of monochromatic visible and near infrared radiation on cells. En: *The science of lower-power Laser Therapy*. 1a ed. Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers, 1998, p. 53-94.

Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J. Photochem Photobiol B*. 1999; 49: 1-17.

Kawakami E, Kashiwagi C, Hora T, Tsutsui T. Effects of canine oviduct epithelial cells on movement and capacitation of homologous spermatozoa in vitro. *An Reprod Sci*. 2001; 68: 121-131.

Knobil E. and Neill JD. In. *The physiology of reproduction*. 2a ed. New York: Raven Press, 1994, p. 1063-1175, 1435-1487.

König K, Tadir Y, Patrizio P, Berns MW, Tromberg BJ. Effects of ultraviolet exposure and near infrared laser tweezers on human spermatozoa. *Hum Reprod*. 1996; 11 (10): 2162-2164.

Koutsarova N, Todorov P, Koutsarov G. Effect of pentoxifylline on motility and longevity of fresh and thawed dog spermatozoa. J. Reprod. Fert. 1997; Suppl. 51, 117-121.

Kumi-Diaka J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. Theriogenology. 1993; 39: 1279-1289.

Kumi-Diaka J, Badtram G. Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen. Theriogenology. 1994; 41: 1355-1366.

Lanzafame RJ, Stadler I, Kurtz AF, Connelly R, Peter TA Sr, Brondon P, Olson D. Reciprocity of exposure time and irradiance on energy density during photoradiation on wound healing in a murine pressure ulcer model. Lasers Surg Med. 2007; 39 (6): 534-542.

Laor Y, Simpson CL, Klein E, Fine S. The pathology of laser irradiation of the skin and body wall of the mouse. Am J Pathol. 1965; 47 (4): 643-663.

Laser H. Some observations on irradiation effects in yeast. Radiat Res. 1962; 16: 471-482.

Lavi R, Shainberg A, Friedmann H, Shneyvays V, Rickover O, Eichler M, Kaplan D, Lubart R. Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. J Biol Chem. 2003; 278 (42): 40917-40922.

Leclerc P, de Lamirande E, Cagnon C. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. Free Radic Biol Med. 1997; 22: 643-656.

Lenzi A, Claroni F, Gandini L, Lombardo F, Barbieri C, Lino A, Dondero F. Laser radiation and motility patterns of human sperm. Arch Androl. 1989;23(3):229-34.

Lindgård A, Hultén LM, Svensson L, Soussi B. Irradiation at 634 nm releases nitric oxide from human monocytes. *Lasers Med Sci Mar.* 2007; 22 (1): 30-36.

Liu Y, Sonek GJ, Berns MW, Tromberg BJ. Physiological monitoring of optically trapped cells: assessing the effects of confinement by 1064-nm laser tweezers using microfluorometry. *Biophys J.* 1996; 71 (4): 2158-67.

Lubart R, Friedmann H, Levinshal T, Lavie R, Breitbart H. Effect of light on calcium transport in bull sperm cells. *J Photochem Photobiol B.* 1992a; 15; 15 (4): 337-41.

Lubart R, Wollman Y, Friedmann H, Rochkind S, Laulicht I. Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. *J Photochem Photobiol B.* 1992b; 28 ;12 (3): 305-310.

Lubart R, Friedmann H, Sinyakov M, Cohen N, Breitbart H. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membranes caused by 780 nm irradiation. *Lasers Surg Med.* 1997; 21 (5): 493-499.

Lubart R, Breitbart H, Sofer Y, Cohen N, Friedmann H, Lavie R. Light irradiation of sperm cells stimulates in-vitro fertilization. Joint international laser conference, 21-23 de setembre 2003, Edimburg, Escòcia.

Lubart R, Eichler M, Lavi R, Friedman H, Shainberg A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23 (1): 3-9.

Lubart R, Lavi R, Friedmann H, Rochkind S. Photochemistry and photobiology of light absorption by living cells. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24 (2): 179-185.

Mahony MC, Gwathmey T. Protein tyrosine phosphorylation during hyperactivated motility of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. *Biol Reprod.* 1999; 60: 2139-1243.

Malt RA. Effects of laser radiation on subcellular components. *Fed Proc.* 1965; 24: Suppl. 14: 122-125.



Mammoto A, Masumoto N, Tahara M, Ikebuchi Y, Omichi M, Tasaka K, Miyake A. Reactive oxygen species block sperm-egg fusion via oxidation of sperm sulfhydryl proteins in mice. *Biol Reprod.* 1996; 55: 1063-1068.

Marín ML, Velez JR. Efectos de la irradiación laser Heio Neon en semen Bovino. [Tesina de Licenciatura]. Antioquia, Medellín. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad de Antioquia, 1990.

Martínez IN, Moran JM, Peña FJ. Two-step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulation in canine ejaculates and its relation to cryoresistance. *J Androl.* 2006; 27: 596-603.

Martínez-Pastor F, García-Macías V, Álvarez M, Herraiz P, Anel L, de Paz P. Sperm subpopulations in iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. *Biol Reprod.* 2005; 72: 316-327.

Mathew M, Amat-Roldan I, Andrés R, Santos S, Artigas D, Soriano E, Loza-Alvarez P. Signalling effect of NIR pulsed lasers on axonal growth. *J Neurosci Methods.* 2010; 186 (2): 196-201.

Mester E. L'ús del raig làser en teràpia. *Orv Hetil.* 1966; 107 (22): 1012. (Article en hongarès).

Miloro M, Halkias LE, Mallery S, Travers S, Rashid RG. Low-level laser effect on neural regeneration in Gore-Tex tubes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 93 (1): 27-34.

Miró J, Lobo V, Quintero-Moreno A, Medrano A, Peña A, Rigau T. Sperm motility patterns and metabolism in catalonian donkey semen. *Theriogenology.* 2005; 63: 1706-1716.

Miyamura Y, Coelho SG, Schlenz K, Batzer J, Smuda C, Choi W, la Brenner M, Passeron T, Zhang G, Kolbe L, Wolber R, Hearing VJ. The deceptive nature of UVA-

tanning versus the modest protective effects of UVB-tanning on human skin. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011; 24 (1): 136-47.

Mohanty SK, Sharma M, Gupta PK. 2006. Generation of ROS in cells on exposure to CW and pulsed near-infrared laser tweezers. *Photochem Photobiol Sci.* 2006; 5 (1): 134-139.

Mortimer D, Serres C, Mortimer ST, Jouannet, P. Influence of image sampling frequency on the perceived movement characteristics of progressively motile human spermatozoa. *Gamete Res.* 1988; 20: 313-327.

Mortimer D, Aitken RJ, Mortimer ST, Pacey AA. 1995. Workshop report: clinical CASA-the quest for consensus. *Reprod Fertil Dev.* 1995; 7: 951-959.

Mortimer ST. CASA - practical aspects. *J Androl.* 2000; 21 (4): 515-524.

Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod.* 2004; 19: 129-138.

Mushayandebvu T, Magier T, Murnick T, Bonder T, Weiss G, Colon J. Sperm membrane response to hypo-osmotic challenge after laser optical trapping at high power. 42nd Annual Meeting of the Society of Gynecologic Investigation, Chicago, Illinois, March 1995. Abstract P308.

Nakabeppu Y, Sakumi K, Sakamoto K, Tsuchimoto D, Tsuzuki T, Nakatsu Y. «Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids». *Biol Chem.* 2006; 387 (4): 373-9.

Nascimento JM, Shi LZ, Chandsawangbhuwana C, Tam J, Durrant B, Botvinick EL, Berns MW. Use of laser tweezers to analyze sperm motility and mitochondrial membrane potential. *J Biomed Opt.* 2008a; 13 (1): 014002.

Nascimento JM, Shi LZ, Tam J, Chandsawangbhuwana C, Durrant B, Botvinick EL, Berns MW. Comparison of glycolysis and oxidative phosphorylation as energy sources for mammalian sperm motility, using the combination of fluorescence imaging, laser tweezers, and real-time automated tracking and trapping. *J Cell Physiol.* 2008b; 217 (3): 745-51.

Nassar A, Mahony M, Morshedi M, Lin MH, Srisombut C, Oehninger S. 1999. Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertil Steril.* 1999; 71: 919-923.

Naz RK, Rajesh PB. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004; 2: 75.

Nelson DL, Cox MM. Glucólisis y catabolismo de las hexosas. En *Lehninger Principios de bioquímica.* 3a ed. Barcelona: Ediciones Omega, 2001, p. 527-566.

Neuwinger J, Behre HM, Nieschlag E. Computerized semen analysis with sperm tail detection. *Hum Reprod.* 1990; 5: 719-723.

Nicolau RA, Martinez MS, Rigau J, Tomas J. Effect of low power 655 nm diode laser irradiation on the neuromuscular junctions of the mouse diaphragm. *Lasers Surg Med.* 2004; 34 (3): 277-284.

Noll F. L-lactate. *Methods of Enzymatic Analysis* vol. VI. Weinheim: Verlag Chemie Bergmeyer (editor), 1984, p. 582-588.

Núñez-Martínez I, Moran JM, Peña FJ. A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. *Reprod Dom Anim.* 2006; 41: 408-415.

Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P, Krawetz SA. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet.* 2002; 360 (9335): 772-777.

Pérez-Llano B, lorenzo JL, Yenes P, Trejo A, Garcia-Casado P. A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology*. 2001; 53: 387-398.

Pawson T. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell*. 2004; 116: 191-203.

Petrunkina AM, Friedeerich J, Drommer W, Bicker G, Waberski D, Topfer-Petersen E. Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic  $CA^{2+}$  concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells. *Reproduction*. 2001; 122: 469-480.

Pfeifer GP, You YH, Besaratinia A. Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res*. 2005; 571 (1-2): 19-31.

Pommer AC, Rutllant J. And Meyers SA. The role of osmotic resistance on equine spermatozoa function. *Theriogenology*. 2002; 58: 1373-1384.

Pukazhenthil BS, Long JA, Wildt DE, Ottinger MA, Armstrong DL, Howard J. *J Androl*. 1998; 19 (6): 675-685.

Quintero-Moreno A. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. [Tesi doctoral]. Bellaterra (Barcelona): Universitat Autònoma de Barcelona. 2003.

Quintero-Moreno A, Miró J, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*. 2003; 59: 1973-1990.

Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. Regression analysis and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology*. 2004; 61 (4): 673-90.

Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. Multivariate cluster analysis regression procedures as tools to identify motile sperm subpopulation in rabbit semen and predict semen fertility and litter. *Reprod Domest Anim.* 2007; 42 (3): 312-319.

Ramió L, Rivera MM, Ramírez A, Concha II, Peña A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. Dynamics of motile-sperm subpopulation structure in boar ejaculates subjected to “in vitro” capacitation and further “in vitro” acrosome reaction. *Theriogenology.* 2008; 69: 501-512.

Ramió L. Dinàmica de la motilitat, fosforil·lació de proteïnes i l'activitat mitocondrial de l'espermatozoide porcí durant la capacitació i reacció acrosòmica “in vitro”. [Tesi doctoral]. Bellaterra (Barcelona): Universitat Autònoma de Barcelona. 2009.

Ramió-Lluch L, Fernández-Novell JM, Peña A, Colás C, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T, Ramírez A, Concha II, Rigau t, Rodríguez-Gil JE. “In vitro” capacitation and acrosome reaction are concomitant with specific changes in mitochondrial activity in boar sperm: evidence for a nucleated mitochondrial activation and for the existence of a capacitation-sensitive subpopulational structure. *Reprod Domest Anim.* 2010 Dec 1. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2010.01725.x.

Rigau J. Acción de la luz Láser a baja intensidad en la modulación de la función celular. [Tesi doctoral]. Reus (Tarragona): Universitat Rovira i Virgili. 1996.

Rigau T, Piedrafita J, Revertes, A; Canal M, Rodríguez-Gil JE. The rate of L-lactate production: a feasible parameter for the fresh diluted boar semen quality analysis. *Anim Reprod Sci.* 1996; 43: 161-172.

Rigau T, Farré M, Ballester J, Mogas T, Peña A. and Rodriguez-Gil JE. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology.* 2001; 56: 801-815.

Rigau T, Rivera MM, Palomo MJ, Fernández-Novell JM, Mogas T, Ballester J, Peña A, Otaegui PJ, Guinovart JJ, Rodríguez-Gil JE. Differential effects of glucose and

fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. *Reproduction*. 2002; 123: 579-591.

Rivera del Álamo MM. Efecto del fotoperíodo sobre la calidad seminal de verracos destinados a inseminación artificial. [Tesi doctoral]. Bellaterra (Barcelona): Universitat Autònoma de Barcelona. 2003.

Rivera MM, Quintero-Moreno A, Barrera X, Palomo MJ, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. 2005. Natural Mediterranean photoperiod does not affect the main parameters of boar-semen quality analysis. *Theriogenology*. 2005; 64 (4): 934-946.

Rizzi CF, Mauriz JL, Freitas Corrêa DS, Moreira AJ, Zettler CG, Filippin LI, Marroni NP, González-Gallego J. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers Surg Med*. 2006; 38 (7): 704-713.

Rochkind S, Rousso M, Nissan M, Villareal M, Barr-Nea L, Rees DG. Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. *Lasers Surg Med*. 1989; 9: 174-182

Rochkind S, Shahar A, Amon M, Nevo Z. Transplantation of embryonal spinal cord nerve cells cultured on biodegradable microcarriers followed by low power laser irradiation for the treatment of traumatic paraplegia in rats. *Neurol Res*. 2002; 24 (4): 355-360.

Rochkind S, Kogan G, Luger EG, Salame K, Karp E, Graif M, Weiss J. Molecular structure of the bony tissue after experimental trauma to the mandibular region followed by laser therapy. *Photomed Laser Surg*. 2004; 22 (3): 249-253.

Rodríguez-Gil JE, Montserrat A, Rigau T. Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology*. 1994; 42: 815-829.

Rodríguez-Gil JE, Rigau T. Effect of slight agitation on the quality of refrigerated boar sperm. Anim Reprod Sci. 1995; 39: 141-146.

Roldan ERS. Signal transduction during mammalian sperm acrosomal exocytosis. En: Lauria A, Gandolfi F, Enne G, Gianaroli L (ed.). Gametes: Development and Function. Roma: Serono Symposia, 1998, p. 219-228.

Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. Mammalian spermatogenesis. En: Histological and histopathological evaluation of the testis. 1a ed. Cache River Press, 1990, p. 1-40.

Saks NM, Roth CA. 1963. Ruby laser as a microsurgical instrument. Science. 1963; 141: 46-47.

Sato H, Landthaler M, Haina D, Schill B. The effects of laser light on sperm motility and velocity in vitro. Andrologia. 1984; 16 (1): 23-25.

Shao B, Esener SC, Nascimento JM, Botvinick EL, Berns MW. Dynamically adjustable annular laser trapping based on axicons. Appl Opt. 2006; 45 (25): 6421-6428.

Shi LZ, Nascimento J, Chandsawangbhuwana C, Berns MW, Botvinick EL. Real-time automated tracking and trapping system for sperm. Microsc Res Tech. 2006; 69 (11): 894-902.

Silveira PC, Silva LA, Fraga DB, Freitas TP, Streck EL, Pinho R. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. J Photochem Photobiol B. 2009; 95 (2): 89-92.

Solon LR, Aronson R, Gould G. Physiological implications of laser beams. Science. 1961; 134: 1506-1508.

Stein E, Koehn J, Sutter W, Wendtlandt G, Wanschitz F, Thurnher D, Baghestanian M, Turhani D. Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. *Wien Klin Wochenschr.* 2008; 120 (3-4): 112-117.

Sten-Knudsen O. *Biological membranes: Theory of transport potentials and electric impulses.* 1a ed. Cambridge: Cambridge University press, 2002.

Stockert JC, Cañete M, Juarranz A, Villanueva A, Horobin RW, Borrell JI, Teixidó J, Nonell S. Porphycenes: facts and prospects in photodynamic therapy of cancer. *Curr Med Chem.* 2007; 14 (9): 997-1026.

Tafur J, Mills PJ. Low-intensity light therapy: exploring the role of redox mechanisms. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26 (4): 323-328.

Tafur J, Van Wijk EP, Van Wijk R, Mills PJ. Biophoton detection and low-intensity light therapy: a potential clinical partnership. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28 (1): 23-30.

Taha MB, Noakes DE, Allen WE. The effect of season of the year on the characteristics and composition of dog semen. *J Small Anim Pract.* 1981; 22 (4): 177-184.

Tardif S, Dubé C, Chevalier S, Bailey JL. Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine-like activity of pig sperm proteins. *Biol Reprod.* 2001; 65: 784-792.

Trelles MA, Mayayo E, Miro L, Rigau J, Baudin G, Calderhead G. The action of Low Reactive Level Laser Therapy (LLLT) on mast cells. a possible pain relief mechanism examined. *Laser Therapy.* 1989; 1 (1): 27-30.

Trelles MA, Vélez M, Rigau J. Interacción de la luz con los tejidos. En: *Láser en dermatología y dermocosmética.* Cisneros JL, Camacho F, Trelles MA. 2a ed. Madrid: Aula Médica Ediciones, 2008, p. 49-64.



Tunér J i Hode L. Some basic laser physics. En Laser therapy. Clinical practice and scientific background. 2a ed. Grängesberg (Sweden): Prima Books, 2002a, p. 1-44.

Tunér J i Hode L. Biostimulation. En Laser therapy. Clinical practice and scientific background. 2a ed. Grängesberg (Sweden): Prima Books, 2002b, p. 61-114.

Vadnais M, Galantino-Homer HL, Althouse GC. Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation. Arch Androl. 2007; 53: 109-123.

Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes C, Telser J. «Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence». Mol Cell Biochem. 2004; 266 (1-2): 37-56.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. «Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease». Int J Biochem Cell Biol. 2007; 39 (1): 44-84.

Van den Safflele J, Vermeulen L, Schoojans F, Comhaire FH. Evaluation of the hypoosmotic swelling test in relation with advanced methods of semen analysis. Andrologia. 1992; 24: 213-217.

Vandewoestyne M, Van Hoofstat D, Van Nieuwerburgh F, Deforce D. Automatic detection of spermatozoa for laser capture microdissection. Int J Legal Med. 2009; 123 (2): 169-175.

Vantman D, Koukoulis G, Dennison L, Zinaman M, Sherins RJ. Computer-assisted semen analysis: evaluation of method and assessment of the influence of sperm concentration on linear velocity determination. Fertil Steril. 1988; 49: 510-515.

Vázquez JM, Martínez EA, Roca L, Blanco O, Lucas X, Matás C. Utilización del analizador de imágenes para la evaluación de la motilidad de los espermatozoides de verraco. IV simposium internacions de Reproducció e Inseminación Artificial, 1997, p. 83-90.

Vélez M, Rigau J, Planas M. Láseres de baja densidad de potencia en Dermatología. En: Láser en dermatología y dermocosmética. Cisneros JL, Camacho F, Trelles MA. 2a ed. Madrid: Aula Médica Ediciones, 2008a, p. 509-520.

Vélez M, Trelles MA, Rigau J. Características técnicas y parámetros dosimétricos de los sistemas láser y otros sistemas luminosos y energéticos. En: Láser en dermatología y dermocosmética. Cisneros JL, Camacho F, Trelles MA. 2a ed. Madrid: Aula Médica Ediciones, 2008b, p. 65-82.

Visconti PE, Galantino-Homer H, Moore GD, Bailey J, Ning X, Fornes M, Kopf GS. The molecular basis of sperm capacitation. J Androl. 1998; 19: 242-248.

Von Buiten A, Zhang J, Boule MS. Integrity of plasma membrane os stallion spermatozoa before and after freezing. J Reprod Fertil. 1989; 4: 11-18.

Wenzel U, Nickel A, Daniel H. Increased mitochondrial palmitoylcarnitine/carnitine countertransport by flavone causes oxidative stress and apoptosis in colon cancer cells. Cell Mol Life Sci. 2005; 62: 3100-3105.

Wu S, Xing D, Gao X, Chen WR. High fluence low-power laser irradiation induces mitochondrial permeability transition mediated by reactive oxygen species. J Cell Physiol. 2009; 218 (3): 603-611.

Xu ZP, Sun HX, Hu YL, Zhang NY, Zhao X. La immobilització assistida per làser no causa dany al DNA espermàtic. Zhonghua Nan Ke Xue. 2007; 13 (3): 216-218. (Article en xinès).

Yamamoto Y, Kono T, Kotani H, Kasai S, Mito M. Effect of low-power laser irradiation on procollagen synthesis in human fibroblasts. J Clin Laser Med Surg. 1996; 14 (3): 129-132.

Yeste Oliveras M. New insights into boar sperm function and survival from integrated laboratory and field studies. [Tesi doctoral]. Girona: Universitat de Girona. 2008.

Zan-Bar T, Bartoov B, Segal R, Yehuda R, Lavi R, Lubart R, Avtalion RR. Influence of visible light and ultraviolet irradiation on motility and fertility of mammalian and fish sperm. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2005; 23 (6): 549-555.

Zaneveld LJD, Polakoski KL. Collection and physical examination of the ejaculate. En: *Techniques of human Andrology*. 1a ed. Hafez, E.S.E., 1977, p. 147-156.

Zaneveld LJD, Jeyendran RS, Krajeeski P, Coetze K, Kruger TF, Lombard CJ. Hypoosmotic swelling test; results and discussion. En: *Human spermatozoa in assisted reproduction*. Baltimore: Williams and Wilkins Inc., 1990, p. 223-228.

Zhang J, Xing D, Gao X. Low-power laser irradiation activates Src tyrosine kinase through reactive oxygen species-mediated signaling pathway. *J Cell Physiol*. 2008; 217 (2): 518-528.



## **GLOSSARI**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DÍODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES

Marc-Ignasi Corral-Baqués

ISBN/ DL:T.1240-201

*Resposta de la motilitat espermàtica a la irradiació amb làser de díode de 655 nm d'emissió*

## 8. GLOSSARI

Per a algunes definicions s'ha recorregut directament al *Diccionari de la llengua catalana* de l'Institut d'Estudis Catalans (IEC) i a Braslavsky (2007).

**Ablatiu.** Amb efectes destructius com carbonització i vaporització.

**Absorció.** Transferència de l'energia d'un camp electromagnètic o fotó a un àtom o molècula de manera que el fotó desapareix. L'energia transmesa per un fotó es pot convertir en un efecte tèrmic, vibracional, químic o electroquímic.

**Absorbància.** Valor numèric de l'absorció que es produeix quan la llum o qualsevol altra energia radiant travessa una substància.

**Acrosoma.** Estructura membranosa localitzada per damunt del nucli en la part anterior del cap de l'espermatozoide, que conté enzims necessaris perquè l'espermatozoide penetri i/o es fusioni amb la membrana plasmàtica de l'oòcit per aconseguir la seva fecundació.

**Anomalies morfològiques primàries.** Són aquelles anomalies produïdes en el testicle durant l'espermatogènesi.

**Anomalies morfològiques secundàries.** Són aquelles anomalies produïdes en l'epidídim o fora del tracte reproductiu.

**Axonema.** És la part interna que forma l'esquelet de cilis i flagels de les cèl·lules eucariotes, amb una constitució bàsicament microtubular que els confereix la motilitat.

**Biomodulació.** Estimulació o inhibició dels processos metabòlics cel·lulars.

**Biomodulador.** Vegeu *biomodulació*.

**Capacitació.** La capacitació espermàtica és el nom que rep el conjunt de canvis moleculars i bioquímics que faran que l'espermatozoide adquireixi la propietat de fecundar l'òcit.

**CASA.** Acròstic de *Computer-aided Sperm Analysis* (anàlisi espermàtica informàticament assistida). Es tracta d'un sistema automàtic d'avaluació de la motilitat espermàtica. Habitualment compost d'una càmera de vídeo per a la captació d'imatges i d'un ordinador. El sistema CASA enregistra el moviment espermàtic per poder quantificar el moviment realitzat per cada espermatozoide.

**Centrosoma.** Regió del citoplasma, on es troben els centríols, que és el centre organitzador de microtúbuls i controlador de la divisió cel·lular.

**Col·limar.** Fer que els raigs a partir del focus lluminós es mantinguin paral·les entre si malgrat la distància, la seva divergència és insignificant.

**Coherència.** Es diu que una font emet una radiació coherent quan totes les ones elementals emeses tenen una diferència de fase constant en l'espai i el temps. En altres termes, quan tots els fotons estan en fase. Estar en fase indica la situació en la qual les longituds d'ona de diferents fotons tenen sincronitzats els pics i les valls.

**Coherent.** Vegeu *coherència*.

**Cromòfor.** Tot àtom o molècula capaç d'absorbir l'energia d'un fotó. Sol ser longitud d'ona dependent i és capaç d'absorbir un sol fotó.

**Densitat d'energia.** Vegeu *fluència*.

**Densitat de potència.** Vegeu *irradiància*.

**Díode.** Vegeu *làser de díode*.

**Diploide.** Cèl·lula que té el nucli amb dues dotacions cromosòmiques.

**Direccional.** Es refereix al fet de mantenir la mateixa direcció tots els fotons d'un feix de llum làser, fent que la secció del feix es mantingui en la distància.

**Dispersió.** Pèrdua de la coherència d'un feix de llum coherent en canviar de medi. En anglès s'anomena *scattering*.

**Dosi.** Energia o quantitat de fotons amb la qual s'ha irradiat un teixit.

**Ejaculat.** Dit del semen resultant d'una ejaculació. No és un terme recollit pel diccionari normatiu de l'IEC, però és d'ús comú i habitual en l'entorn de la reproducció a veterinària per referir-se al total de l'esperma d'una ejaculació.

**Espectre.** Representació de la descomposició d'una ona composta en ones simples de longituds d'ona o de freqüència característiques. (IEC)

**Espermatogènesi.** Procés de formació dels gàmetes masculins. (IEC)

**Espermatozoide.** És la cèl·lula sexual masculina destinada a la fecundació de l'òocit madur, que s'origina als testicles a partir dels espermatogonis. (IEC)

**Espermatozoide madur.** Es caracteritza per la pèrdua de la gota citoplàsmica (condensació de les restes citoplasmàtiques de l'evolució celular de l'espermàtide a espermatozoide), i que ha adquirit la capacitat mòtil i de fecundar.

**Fecundació.** Procés inherent a la reproducció sexual en què es produeix la unió de dues cèl·lules haploides o gàmetes a fi d'originar una cèl·lula diploide o zigot, d'on sorgirà un nou individu. (IEC)

**Flagel.** Prolongació citoplasmàtica filiforme, llarga i mòbil, única o múltiple, que serveix com a òrgan de locomoció en pròtists, gàmetes mòbils, bacteris, etc. (IEC)

**Fluència.** Densitat d'energia irradiada, resulta de dividir l'energia total irradiada per la superfície de l'*spot*.



**Fosforilació.** Incorporació d'un grup fosfat a una molècula. La fosforilació/desfosforilació és un dels mecanismes més comuns emprats per les cèl·lules per a la regulació de les funcions biològiques de les proteïnes. També juguen un paper central en el metabolisme energètic de les cèl·lules.

**Fotó.** Quàntum d'energia d'una radiació electromagnètica, el valor de la qual és igual al producte de la freqüència de la radiació  $\nu$  per la constant de Planck  $h$ . (IEC)

**Fotoablatiu.** Conversió de l'energia fotònica absorbida de manera que coagula, carbonitza o vaporitza un teixit biològic.

**Fotoacústic (efecte).** Conversió de l'energia fotònica absorbida en una ona de pressió.

**Fotobiomodulador (efecte).** Estimulació o inhibició dels processos metabòlics cel·lulars mitjançant fotons.

**Fotocitotòxic (efecte).** Estimulació lesiva cel·lular resultant de la seva irradiació que pot acabar donant mort cel·lular (apoptosi).

**Fotònica.** Ciència que té per objecte l'estudi de la creació, control i detecció de fotons, així com de les seves interaccions amb la matèria.

**Fotoquímic (efecte).** Reacció química causada per l'absorció de l'energia fotònica.

**Fotosensibilitzador.** Dit de la substància que catalitza les reaccions fotoquímiques en presència de llum.

**Freqüència.** Nombre de vegades que es repeteix un esdeveniment; en el cas del fotó, nombre d'ones que es donen en un segon.

**Haploide.** Cèl·lula que posseeix una dotació cromosòmica formada per una sola sèrie de cromosomes.

**Infraroig.** Regió de l'espectre electromagnètic que s'estén aproximadament dels 780 als 20000 nm.

**Interferència.** Interacció entre dues o més ones. En cada punt el camp elèctric de la interferència serà la suma dels camps elèctrics de les ones implicades. Perquè hi hagi interferència cal que els diferents feixos de fotons siguin coherents, tinguin la mateixa freqüència i amb vectors de camp elèctric paral·lels.

**Irradiància.** Densitat de potència de l'energia irradiada, resulta de dividir la potència del feix de radiació emergent per la superfície de l'*spot*.

**Lasejar.** Acció d'un material de reemetre l'energia rebuda en forma de raig làser.

**Làser.** Font de radiació ultraviolada, visible o infraroja que produeix l'emissió de llum amplificada per emissió estimulada de radiació (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, d'on se'n deriva l'acrònim LASER). Tots els làsers contenen una substància energitzada que pot augmentar la intensitat de la radiació que hi passa a través. El medi d'amplificació pot ser sòlid, líquid o gasós. La radiació emesa es caracteritza per ser: monocromàtica, coherent i direccional.

**Làser de díode.** És un tipus de làser en el qual el medi actiu és un semiconductor que en ser excitat elèctricament emet un feix làser. El material del qual està format el semiconductor determina la longitud d'ona dels fotons emesos.

**Least Squares Means.** Mitjanes quadràtiques mínimes (LSMEANS).

**Madur.** Vegeu *espermatozoide madur*.

**Melanina.** Pigment fosc responsable del color de la pell, del pèl i de l'iris dels mamífers. Resulta de la polimerització de la indolecínasa, la qual prové de l'oxidació de la tirosina; el procés és produït pels raigs ultraviolats. Serveix per protegir els nuclis de les cèl·lules de l'epidermis contra les radiacions solars.

**Mòtil.** Referent a la motilitat. No és un terme recollit pel diccionari normatiu de l'IEC, però que és d'ús comú i habitual en l'entorn de la reproducció a veterinària per fer referència a la motilitat dels espermatozoides, així com als seus paràmetres associats.

**Motilitat.** Facultat de moure's espontàniament o en resposta a estímuls de diversa mena.

**Motilitat progressiva.** Percentatge d'espermatozoides que es desplacen de manera efectiva.

**Normalització.** Vegeu *normalitzar dades*.

**Normalitzar dades.** La normalització és una transformació matemàtica de les dades que no segueixen una distribució normal en dades que sí que la tenen.

**Nucli.** Orgànul basòfil de les cèl·lules eucariotes que està envoltat per una doble membrana, conté els cromosomes i és essencial per a funcions de la cèl·lula com la reproducció i la síntesi de proteïnes. (IEC)

**Oòcit.** Cèl·lula sexual femenina. (IEC)

**Polarització.** Condició en la qual les molècules mantenen una certa orientació.

**Pool.** Conjunt de diferents ejaculats com si d'un sol ejaculat es tractés.

**Potència.** Magnitud escalar que mesura el treball fet per un sistema en la unitat de temps.

**Quàntum.** Quantitat elemental discreta d'energia postulada. (IEC)

**Radiació.** Emissió i transferència d'energia en forma d'ones electromagnètiques o partícules. És la forma de propagació de l'energia en l'espai sense requerir de la participació d'un medi conductor entre la font emissora i el receptor.

**Raigs ultraviolats.** Vegeu *ultraviolat*.

**Reflexió.** És el canvi de direcció que experimenta un feix de llum en incidir sobre una superfície de separació de dos medis i hi rebotja, retornant al primer medi.

**Refracció.** En canviar de medi pel qual viatja la llum, es produeix un canvi de velocitat i el feix de llum es desvia de la seva trajectòria original (vegeu també *índex de refracció*).

**Ressonància.** Fenomen físic que consisteix en un bescanvi òptim d'energia entre dues variables periòdiques que tenen la mateixa freqüència.

**Ressonant.** Capaç d'entrar en ressonància (vegeu *ressonància*).

**Ressonar.** Donar lloc a la ressonància (vegeu *ressonància*).

**ROS.** Les espècies reactives de l'oxigen o ROS (de l'anglès *Reactive Oxidative Species*) són molècules que es produeixen en les cèl·lules resultants de reaccions d'oxidació-reducció incompletes on intervé l'oxigen.

**Spot.** Àrea d'incidència del feix làser sobre la superfície irradiada.

**Subpoblació.** Nom que reben les diferents agrupacions, amb característiques mòtils semblants, en què s'estructuren els espermatozoides d'un ejaculat.

**Transmissió.** Dit de l'acció del fotó de traspasar i sortir d'un medi.

**Ultraviolat (UV).** Regió de l'espectre electromagnètic que s'estén aproximadament dels 200 als 400 nm. Els ultraviolats es divideixen en A (315-400 nm), B (280-315 nm) i C (100 a 280 nm).

**Unidireccional.** Es diu d'un feix de llum que és unidireccional quan els seus fotons tenen una sola direcció de resultes de la colimació.

**UVC.** *Vegeu raigs ultraviolats.*

**Zigot.** Cèl·lula amb una doble dotació cromosòmica formada per la fusió d'un gàmeta femení amb un de masculí abans de començar la segmentació.



## **ANNEX: ARTICLES PUBLICATS**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DíODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES

Marc-Ignasi Corral-Baqués

ISBN/ DL:T.1240-201

*Resposta de la motilitat espermàtica a la irradiació amb làser de díode de 655 nm d'emissió*

M. I. Corral-Baqués · T. Rigau · M. Rivera  
J. E. Rodríguez · J. Rigau

## Effect of 655-nm diode laser on dog sperm motility

Received: 3 February 2005 / Accepted: 22 February 2005 / Published online: 19 April 2005  
© Springer-Verlag London Limited 2005

**Abstract** Sperm motility depends on energy consumption. Low-level laser irradiation increases adenosin triphosphate (ATP) production and energy supply to the cell. The aim of this study is to analyse whether the irradiation affects the parameters that characterise dog sperm motility. Fresh dog sperm samples were divided into four groups and irradiated with a 655-nm continuous-wave diode laser with varying doses: 0 (control), 4, 6 and 10 J/cm<sup>2</sup>. At 0, 15 and 45 min following irradiation, pictures were taken of all the groups in order to study motility with computer-aided sperm analysis (CASA). Functional tests were also performed. Average path velocity (VAP), linear coefficient (Lin) and beat cross frequency (BCF) were statistically and significantly different when compared to the control. The functional tests also showed a significant difference. At these parameters, the 655-nm continuous-wave diode laser improves the speed and linear coefficient of the sperm.

**Keywords** Semen quality · Low-power laser

**Abbreviations** ALHmean: Mean amplitude of lateral head displacement · ATP: Adenosin triphosphate · BCF: Beat cross frequency · CASA: Computer-aided sperm analysis · DNC: Dance · HLO: Minimum harmonic oscillation of the head · HOST: Hypoosmotic swelling test · Lin: Linear coefficient · MT: Total motility · SEM: Statistical error means · VAP: Average path velocity

### Introduction

The role of a spermatozoon is to deliver the male's genetic material to an oocyte during fertilisation. For this reason, motility is one of the most important parameters. For motility, spermatozoa require the development of a tail (flagellum), which is sensitive to all sorts of internal and external modulatory factors [1]. Sperm mitochondria, which, in mammals, are structured in a mitochondrial sheath, seem to play an important role in the modulation of the tail activity. From a functional point of view, motility is strongly related to the ability of the spermatozoon to manage its energy status for the contractibility of the tail [36]. Therefore, modulation of energy status could translate into significant changes in motility patterns [30]. Physiologically, these changes are seen in spermatozoa as they make their way through the female genital tract.

Laser energy is absorbed by cells and it is used in whatever function they are engaged at the time of irradiation (i.e. mitosis, synthesis etc.) [2, 28].

Using lasers is an optimal way of delivering energy to cells; Karu [19] suggested that the cytochromes from the internal mitochondrial membrane absorb various light wavelengths, leading to an increase in ATP synthesis. Amat et al. [3] suggested that other molecules like ATP respond to light.

In the clinical use of low-level laser therapy and when studying how the cell uses the photonic energy, the effects are more outstanding when the cells or

M. I. Corral-Baqués · J. Rigau  
Department of Basic Medical Sciences,  
Faculty of Medicine and Health Sciences,  
Rovira i Virgili University,  
Reus, Spain

T. Rigau · M. Rivera · J. E. Rodríguez  
Animal Reproduction Unit,  
Faculty of Veterinary Medicine,  
Autonomous University of Barcelona,  
Bellaterra, Spain

M. I. Corral-Baqués (✉)  
Unitat de Reproducció Animal,  
Departament de Medicina i Cirurgia Animal,  
Facultat de Medicina Veterinària,  
Universitat Autònoma de Barcelona,  
08193 Bellaterra, Spain  
E-mail: marcignasi@yahoo.co.uk  
Fax: +34-93-5812006



tissues are under stress (due to lack of oxygen, glucose etc.) [39, 40].

Several studies have used lasers to immobilise spermatozooids [26, 9] but very few have used lasers to stimulate them. Particularly interesting is the minor thesis on the effects of HeNe laser irradiation on bull sperm [24]. These authors found significant changes in the irradiated sperm compared to the control. Unfortunately, however, they provided no specifications on the laser features or the form of irradiation. Also, Lubart et al. [23] presented a study on rat sperm irradiation, and found no improvement in sperm motility.

The main purpose of this study was to evaluate how exposure to a 655-nm continuous-wave diode laser irradiation affects sperm motility and sperm functional parameters, such as the hypoosmotic swelling test (HOST) [21, 35] and the rhythm of L-lactate production [29]. Our results indicate that sperm responds to laser stimulation.

## Materials and methods

### Sperm samples

Semen was collected by manual stimulation in glass collectors warmed to 37°C and separated into three fractions. The second fraction (which is the sperm-rich fraction) of fresh beagle sperm (from the experimental kennels at the Faculty of Veterinary Science of the Autonomous University of Barcelona) was kept from being exposed to light and at a constant temperature in polystyrene foam boxes for further examination. The prostate fluid is not necessary to evaluate spermatozoa for motility or morphology [13]. After a smear to establish its quality, each sample was divided into four groups, one control group and three groups, to be irradiated. The research with animals was done following the law on animal protection for research and other scientific purposes approved by the Parliament of Catalonia on 21st June 1995 (5/1995).

Sperm quality was established by the usual means, i.e. eosin–nigrosin vital dye, to establish sperm viability, acrosomal status and any morphological abnormalities [42].

### Laser source and irradiation procedure

The light source was a 655-nm wavelength diode laser (SORISA), with an average output power of 21.7 mW and with a 0.56 cm<sup>2</sup> spot.

For stability, the laser was turned on 15 min before the measurements were taken. Output power measurements were taken with a high sensitivity thermal sensor connected to a Coherent FieldMaster/GS to calculate the irradiation time.

Each sperm sample was divided into four groups: one control group and three groups to be irradiated with 4, 6

and 10 J/cm<sup>2</sup>, respectively; for the irradiation times, see Table 1. In dark conditions, the samples were distributed in 1-ml espectrophotometry trays. The optic fibre was placed just above the tray opening so that the beam spot was as big as the tray surface. Irradiation was done from above so that the whole sample was irradiated homogeneously (usual way to irradiate liquid samples). The basic irradiation dose (6 J/cm<sup>2</sup>) was the most effective of those proposed by Marín and Velez [24]. We also chose to irradiate with doses above and below this dose.

### Image acquisition for the motility analysis

We used the computer-aided sperm analysis (CASA) automatic system [11, 14, 16, 17] to determine the effect of laser on sperm motility because it provides greater objectivity, sensitivity and security than the optical method [15].

The equipment consists of a phase contrast microscope connected to a 37°C warmed slide. A high-resolution video camera is connected to the microscope, which is connected to a computer. The software used was the Sperm Class Analyzer V5.0 (Microptic, Barcelona).

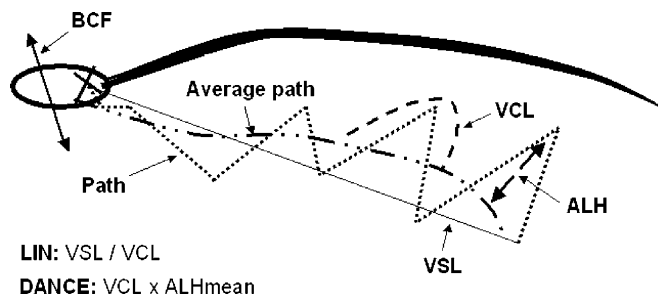
After irradiation, 0.1 ml was removed from each sample to check the immediate effect. Later measurements at 15, 30 and 45 min were taken from each container (control, 4, 6 and 10 J/cm<sup>2</sup>). In this way, we analysed the motility of 2,863 spermatozooids. The motility parameters studied (see Table 2 and Fig. 1) were: average path velocity (VAP), linear coefficient (Lin), mean amplitude of lateral head displacement (ALHmean), dance (DNC), minimum harmonic oscillation of the head (HLO), beat cross frequency (BCF) and total motility (MT) following the selection method of Rivera et al. [32].

### Functional tests

The L-lactate production rate was determined following the technique described by Rodriguez-Gil and Rigau [33] to measure sperm metabolic capacity. Sperm samples at 15 min after irradiation (including the control) were incubated at 37°C for 1 h in 99 µl of an isoosmotic solution (pH 7.4) with 2.94% (w/v) fructose and an osmotic pressure of 300 ± 15 mOsm (mean value ± SEM of 7 determinations). Protein quantity was determined as

**Table 1** Time of irradiation (T) of each sample, depending on the energy density (ED), also called radiant exposure, the power (P) and the spot of the laser beam

ED (J/cm <sup>2</sup> )	P (mW)	Spot (cm <sup>2</sup> )	T (s)
4	21.7	0.56	103
6	21.7	0.56	154
10	21.7	0.56	258



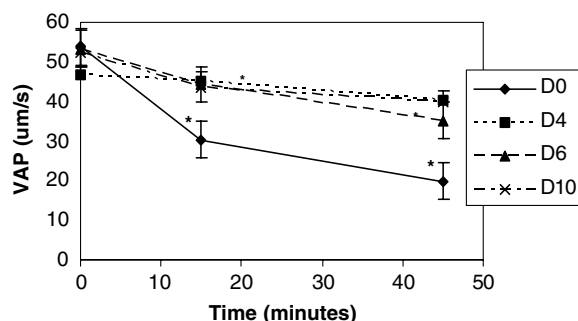
**Fig. 1** Graphical representation of the main motility parameters studied, as explained in Table 2

described by Bradford [4]. L-lactate was determined following the enzymatic method described by Noll [27]. L-lactate production is expressed in  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  of protein in 60 min.

The hypoosmotic swelling test (HOST) evaluates the functional capacity of the spermatozoids. When spermatozooids are placed in a hypoosmotic environment, they react, when functional, by swelling and bending their tails. The percentage of swollen tails is, therefore, directly proportional to sperm quality [12, 21, 22, 35]. Fifteen min after irradiation, aliquots were made with 100  $\mu\text{L}$  of sperm and 900  $\mu\text{l}$  of medium previously heated at 37°C. The mixture was kept at 37°C for 15 min. Twenty five  $\mu\text{l}$  were then extracted to evaluate the spermatozooids. The isoosmotic medium (osmotic pressure  $\pi = 300 \pm 15$  mOsm) was composed of 3.7% (w/v) dehydrated sodium citrate in distilled water.

**Table 2** Meanings and abbreviations of the motility parameters

Acronym	Name	Meaning
VAP	Average path velocity	Mean trajectory of the spermatozoa per unit of time ( $\mu\text{m}/\text{s}$ )
VCL	Curvilinear velocity	Sperm velocity along its real path ( $\mu\text{m}/\text{s}$ )
VSL	Straight line velocity	Travelled distance by the sperm in a straight line from the initial point to the last point divided by time ( $\mu\text{m}/\text{s}$ )
LIN	Linear coefficient	$\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL}$ (%)
ALHmean	Mean amplitude of lateral head displacement	Head displacement in its curvilinear path from one side to the other of the mean path ( $\mu\text{m}$ )
DNC	Dance	$\text{DNC} = \text{VCL} \times \text{ALHmean}$ ( $\mu\text{m}^2/\text{s}$ )
HLO	Minimum harmonic oscillation of the head	The shortest distance between the VCL path and the VAP ( $\mu\text{m}$ )
BCF	Beat cross frequency	Number of lateral oscillatory movements of the sperm head around the mean path, expressed in Hz
MT	Total motility	The percentage of spermatozoa that show a VCL of over 20 $\mu\text{m}/\text{s}$



**Fig. 2** Evolution of the VAP ( $\mu\text{m}/\text{s}$ ) over time (min) according to the irradiated dose (D0=control, D4=4  $\text{J}/\text{cm}^2$ , D6=6  $\text{J}/\text{cm}^2$ , D10=10  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Results are expressed as means  $\pm$  SEM for 8 samples. The asterisks show the points where the statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) are with respect to time 0

The hypoosmotic medium ( $\pi = 150 \pm 20$  mOsm) contained 1.3% fructose (w/v) and 0.7% (w/v) dehydrated sodium citrate [35]. The sample was evaluated using the vital dye and bend tails of the osmotic and hypoosmotic media were counted (up to 12,800 spermatozooids were counted). The percentage of bend tails was calculated by subtracting the number of bend tails in the isoosmotic medium from those in the hypoosmotic medium.

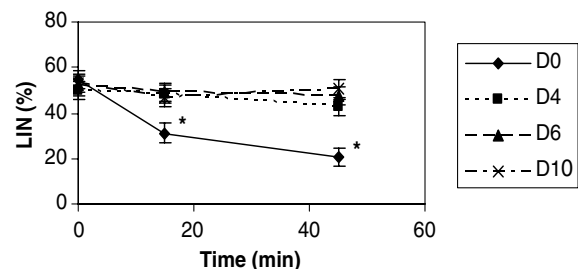
### Statistical analysis

The general linear models (GLM) analysis was applied to the variance (statistical package SAS) of the mean results obtained by CASA. Statistical significance was set at ( $P < 0.05$ ).

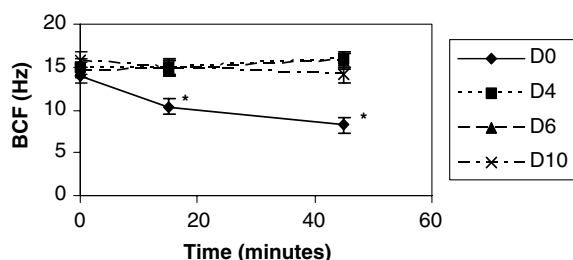
## Results

### Motility parameters

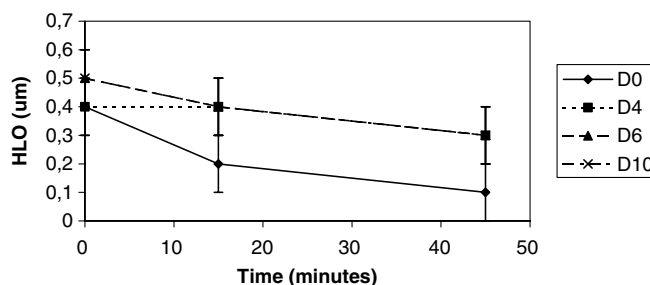
Figures 2, 3 and 4 show that the VAP, LIN and BCF of the control groups significantly decreased ( $P < 0.05$ ) at 15 and 45 min, while those of the irradiated groups



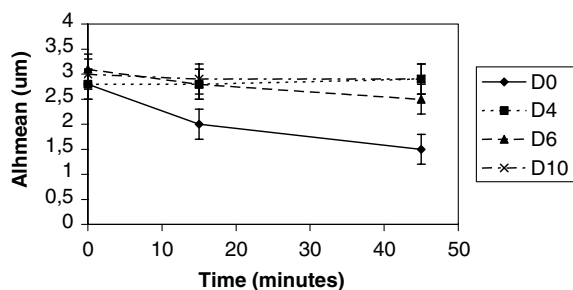
**Fig. 3** Evolution of the LIN (%) over time (min) according to the irradiated dose (D0=control, D4=4  $\text{J}/\text{cm}^2$ , D6=6  $\text{J}/\text{cm}^2$ , D10=10  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Results are expressed as means  $\pm$  SEM for 8 samples. The asterisks show the points where the statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) are with respect to time 0



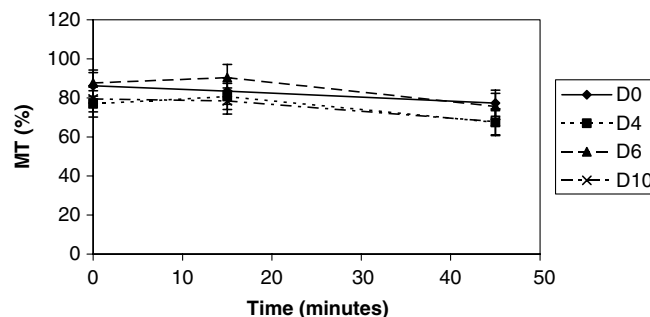
**Fig. 4** Evolution of the BCF (Hz) over time (min) according to the irradiated dose (D0=control, D4=4 J/cm<sup>2</sup>, D6=6 J/cm<sup>2</sup>, D10=10 J/cm<sup>2</sup>). Results are expressed as means±SEM for 8 samples. The *asterisks* show the points where the statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) are with respect to time 0



**Fig. 7** Evolution of the HLO (µm) over time (min) according to the irradiated dose (D0=control, D4=4 J/cm<sup>2</sup>, D6=6 J/cm<sup>2</sup>, D10=10 J/cm<sup>2</sup>). Results are expressed as means±SEM for 8 samples



**Fig. 5** Evolution of the ALHmean (µm) over time (min) according to the irradiated dose (D0=control, D4=4 J/cm<sup>2</sup>, D6=6 J/cm<sup>2</sup>, D10=10 J/cm<sup>2</sup>). Results are expressed as means±SEM for 8 samples

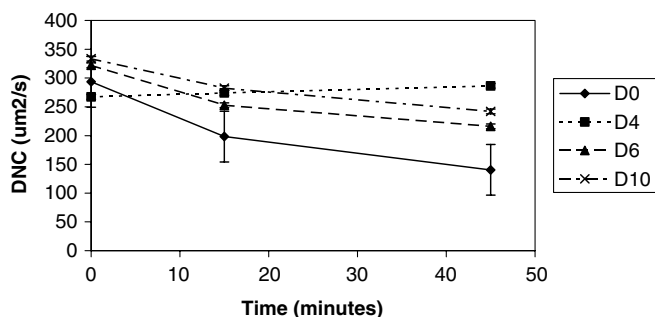


**Fig. 8** Evolution of the MT (%) over time (min) according to the irradiated dose (D0=control, D4=4 J/cm<sup>2</sup>, D6=6 J/cm<sup>2</sup>, D10=10 J/cm<sup>2</sup>). Results are expressed as means±SEM for 8 samples

remained constant for at least up to 45 min after irradiation.

Figures 5, 6 and 7 show that the ALHmean, DNC and HLO of the control groups tended to decrease at 15 and 45 min, although this was not significant, while those of the irradiated groups remained constant for at least up to 45 min after irradiation.

Figure 8 shows that, unlike the behaviour of the irradiated groups, the MT of the control group did not change at 15 nor 45 min after irradiation.

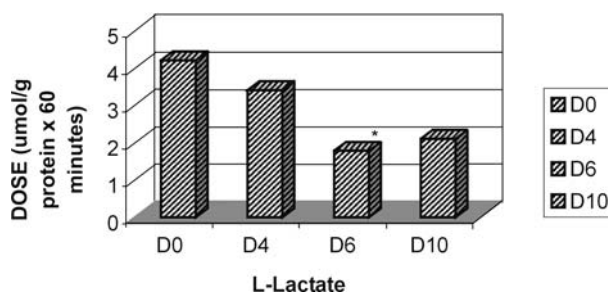


**Fig. 6** Evolution of the DNC (µm<sup>2</sup>/s) over time (min) according to the irradiated dose (D0=control, D4=4 J/cm<sup>2</sup>, D6=6 J/cm<sup>2</sup>, D10=10 J/cm<sup>2</sup>). Results are expressed as means±SEM for 8 samples

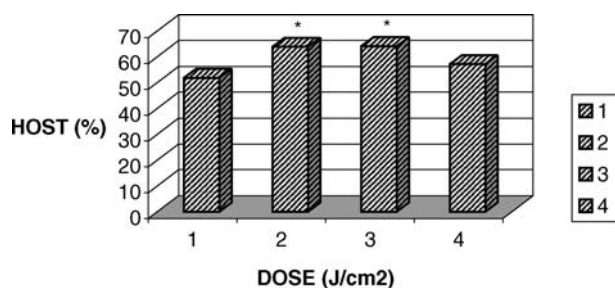
#### Functional tests

Figure 9 shows that, unlike the other groups, the L-lactate production of the group irradiated with 6 J/cm<sup>2</sup> decreased significantly ( $P = 0.0512$ ) (even though it was larger than  $P = 0.05$ , we considered it as significantly decreased).

Figure 10 shows that, unlike the control and the group irradiated with 10 J/cm<sup>2</sup>, HOST results from the groups irradiated with 4 and 6 J/cm<sup>2</sup> increased significantly ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 9** Evolution of the production of L-lactate and the applied dose (D0=control, D4=4 J/cm<sup>2</sup>, D6=6 J/cm<sup>2</sup>, D10=10 J/cm<sup>2</sup>). Results are expressed as means±2.50SEM for 8 samples. The *asterisk* shows the column where the statistically significant difference ( $P < 0.0512$ ) is with respect to the control



**Fig. 10** HOST evolution according to the applied dose ((1=control, 2=4 J/cm<sup>2</sup>, 3=6 J/cm<sup>2</sup>, 4=10 J/cm<sup>2</sup>). Results are expressed as means  $\pm$  2.50SEM for 8 samples. The *asterisks* show the columns where the statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) are with respect to the control

## Discussion

Motility is a key feature in mammalian sperm to deliver the male's genetic material to an oocyte during fertilisation. It is also finely regulated, since sperm requires different types of movement, depending on their location inside the female genital tract and their proximity to oocyte. The sperm tail is the main organelle linked to motility. Its main, highly complex structure reflects the adaptability to fast changes that characterises its function. In this sense, one of the most striking characteristics of mammalian sperm is the fusion of mitochondria in a mitochondrial sheath, which is located around the apical portion of the tail [10]. The close spatial relationship between mitochondria and the tail in sperm indicates a concomitant close relationship between the functionality of both structures. In fact, several reports indicate that there is a direct correlation between motility and mitochondrial activity, at least in humans [38]. However, the mechanisms by which this close relationship is established are not fully understood. It has been suggested that mitochondria provide the energy needed for the tail to maintain its contractibility [10]. At first glance, this contradicts the fact that, in most species, such as boar [25], more than 95% of the synthesised adenosin triphosphate (ATP) comes from glycolysis, whereas Krebs cycle provides less than 1% of the total amount of ATP. This seems to indicate that mitochondria can play roles other than just energy supply which are needed to maintain the tail function, e.g. the regulation of the calcium flux and membrane potential [37]. At any rate, it is evident that mitochondrial function plays a key role in the control of the specific sperm motility *in vivo*.

We know that photon energy is absorbed at several cellular levels and that the cell organelle with the greatest concentration of chromophores is the mitochondria membrane, specifically, at the cytochromes of the electronic transport chain. In 1998, Karu pointed out that the cytochrome a/a<sub>3</sub> is the one that particularly absorbs the 655-nm photons. It seems that absorption at the end of the breathing chain eases the synthesis of ATP [20].

It has recently been proven that ATP plays an important role in the response of cells to light and

increasing energy bioavailability [3]. This proves that a cell has different ways to absorb and transform photon energy into useful energy for the cell.

Not all the biological interaction mechanisms are known, nor do all the cells behave in the same way when affected by the same wavelength. For this reason, it is difficult to extrapolate the effects from one cell type to another, but we can state that, at a molecular level, the activation of certain receptors or messengers determine universal biological responses.

We have studied the effects of a 655-nm continuous-wave diode laser radiation on sperm motility. After obtaining the sperm, the spermatozooids continue losing motility, which is an important negative factor in artificial insemination. In this study, we found that the irradiated sperm maintains and improves its motility features over time (at 15 and 45 min). At the same time, there is a decrease in L-lactate production compared to that of the control, which can result from a change to an aerobic metabolism for energy production or because there is a more effective way of using the energy.

We have also shown in this experiment that the movement of the irradiated sperm is straighter than that of the control. This means that movement is more effective and the energy efficiency to cover the same distance is greater (less production of lactate). Therefore, laser light do not just work on energy production, but also saves energy, as shown by this optimisation of movement.

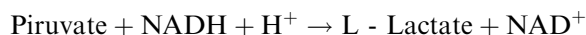
As the sperm features change during their various stages of growth, we need greater knowledge of the light energy interaction in the spermatozoid. This would enable the right laser wavelength for each cell activity to be optimised or administered more effectively (depending on the specific chromophores).

The results with the 655-nm wavelength cannot be extrapolated to other wavelengths because we already know that the biological response is wavelength-dependent at equal doses [41]. Clinical and experimental studies show that laser therapy has its greatest effects on cells, tissues and organs that are affected by a generally deteriorated condition [40], and we still do not know how stressed or low-quality sperm would react to laser irradiation.

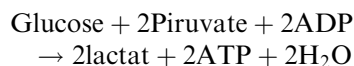
In this experiment, we changed the energy density (radiant exposure) only and did not change any other important parameters, such as power density (irradiance) [8, 41].

The hypoosmotic swelling test (HOST) results also show that laser light improves the functional quality. The HOST response depends on membrane functionality and storage time [18, 22, 35]. This is because tail swelling is an active process controlled by the osmotic pump. This has been proven for dogs and horses, for which the specific inhibition of some of these pumps, such as the ATPase Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> dependent and the Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> antiporter, significantly alter the HOST response [5, 6, 7, 34].

L-lactate is produced from piruvate when oxygen levels are limited in glucolysis. The NADH reduction of piruvate to produce lactate is catalysed by the lactate dehydrogenase:



The global reaction of the glucose conversion into lactate is:



The L-lactate results are harder to explain. This is mainly due to the energetic and metabolic nature of dog sperm, where catabolic and anabolic paths are mixed [31]. It could be speculated that the decrease in L-lactate production is related to the change in the movement pattern of spermatozoids. Laser energy is absorbed at the mitochondria [20]. Related to this, Amat [3] showed that ATP energy bioavailability increases after laser irradiated ATP, which indicates that, in vivo, the laser treatment may activate the metabolism, directing it to the Krebs cycle and oxidative phosphorylation instead of the formation of lactate. This would increase sperm motility efficiency and justify the observed increase in speed and linear coefficient in our results. This improvement in and maintenance of sperm motility over time opens up a wide range of research possibilities. One of these is the economic importance of using low-level laser irradiation to maintain sperm meant for artificial insemination. Another useful behaviour is the maximum delay, between obtaining and irradiating the sample, at which the sperm still reacts positively to the laser light. An interesting study would also be to analyse how sperm would react to other wavelengths.

## Conclusion

Irradiating dog sperm with a 655-nm continuous-wave diode laser at 4, 6 and 10 J/cm<sup>2</sup> energy density doses improves its motility features and seems to maintain its functional characteristics over time (at least up to 45 min after irradiation).

Laser irradiation decreases the L-lactate production rate. Changes in the motility pattern may be related to an increase in the energetic efficiency, indicated by the decreasing lactate production.

**Acknowledgements** We would like to thank SORISA for providing us with the laser and the power meter equipment.

## References

- Albarracin JL, Mogas T, Palomo MJ, Peña A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE (2004) In vitro capacitation and acrosome reaction of dog spermatozoa can be feasibly attained in a defined medium without glucose. *Reprod Dom Anim* 39:129–135
- Almeida-Lopes L, Rigau J, Amaro Zângaro R, Guidugli-Neto J, Jaeger MM (2001) Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med* 29:179–184
- Amat A, Nicolau R, Rigau J, Tomàs J (2002) Energy light interaction with molecules with high energy bond. In: *Proceedings of XVIII Congresso Brasileiro de engenharia biomédica*, San Jose dos Campos, Sao Paolo, 9–12 September 2002, ALB-65–2, p 91
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–256
- Caiza de la Cueva FI, Rigau T, Miró J, Bonet S, Briz M, Rodríguez-Gil JE (1997a) Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: effects of ouabain. *Theriogenology* 47:765–784
- Caiza de la Cueva FI, Pujol MR, Rigau T, Bonet S, Miró J, Briz M, Rodríguez-Gil JE (1997b) Resistance to osmotic stress of horse spermatozoa: the role of ionic pumps and their relationship to cryopreservation success. *Theriogenology* 48:947–968
- Caiza de la Cueva FI, Rigau T, Pujol MR, Piedrafita J, Rodríguez-Gil JE (1997c) Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: the role of the ionic pumps and the relationship with cryosurvival. *Anim Reprod Sci* 48:301–315
- Cisneros JL, Camacho F (2000) Láser y fuentes de luz pulsada intensa en dermatología y dermocosmética. *Aula Médica Ediciones*, Madrid, pp 57–68
- Ebner T, Moser M, Yaman C, Sommergruber M, Tews G (2002) Successful birth after laser assisted immobilization of spermatozoa before intracytoplasmatic injection. *Fertil Steril* 78(2):417–418
- Eddy EM, O'Brien DA (1988) The spermatozoon. In: Knobil E, Neill JD (eds) *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York, pp 27–77
- Ellington J, Scarlett J, Meyers-Wallen V, Mohammed HO, Surman V (1993) Computer-assisted sperm analysis of canine spermatozoa motility measurements. *Theriogenology* 40:725–733
- England GCW, Plummer JM (1993) Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *J Reprod Fert Suppl* 47:261–270
- Feldman EC, Nelson RW (1996) Clinical and diagnostic evaluation of the male reproductive tract. In: *Canine and feline endocrinology and reproduction*, 2nd edn. WB Saunders, Philadelphia, pp 673–690
- Günzel-Apel AR, Günther C, Terhaer P, Bader H (1993) Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa. *J Reprod Fert Suppl* 47:271–278
- Holt WV, Watson P, Curry M, Holt C (1994) Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different systems used in a practical workshop. *Fertil Steril* 62:1277–1282
- Iguer-Ouada M, Verstegen JP (2001a) Validation of the sperm quality analyzer (SQA) for dog sperm analysis. *Theriogenology* 55:1143–1158
- Iguer-Ouada M, Verstegen JP (2001b) Evaluation of the “Hamilton Thorn computer-based automated system” for dog semen analysis. *Theriogenology* 55:733–749
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Zaneveld LJ (1992) The hypoosmotic swelling test: an update. *Arch Androl* 39:1279–1289
- Karu T (1998a) The science of lower-power laser therapy. Gordon and Breach, Amsterdam, The Netherlands
- Karu T (1998b) The science of lower-power laser therapy. Gordon and Breach, Amsterdam, The Netherlands, pp 53–73
- Kumi-Diaka J (1993) Subjecting canine semen to the hypoosmotic test. *Theriogenology* 39:1279–1289
- Kumi-Diaka J, Badtram G (1994) Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen. *Theriogenology* 41:1355–1366

23. Lubart R, Breitbart H, Sofer Y, Cohen N, Friedmann H, Lavie R (2003) Light irradiation of sperm cells stimulates in-vitro fertilization. In: Proceedings of the joint international laser conference, Edinburgh, Scotland, 21–23 September 2003
24. Marín ML, Velez JR (1990) Efectos de la irradiación laser Heio Neon en semen Bovino. [Tesis de Licenciatura]. Antioquia, Medellín. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad de Antioquia, Columbia
25. Marín S, Chiang K, Bassilian S, Lee WNP, Boros LG, Fernández-Novell JM, Centelles JJ, Medrano A, Rodríguez-Gil JE, Cascante M (2003) Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Lett* 554:342–346
26. Mushayandebvu T, Magier S, Murnick D, Bonder E, Weiss G, Colon J (1995) Sperm membrane response to hypo-osmotic challenge after laser optical trapping at high power. *J Soci Gynecol Invest* 2(2):370
27. Noll F (1984) L-lactate. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis*, vol 4. Verlag Chemie, Weinheim, Germany, pp 582–592
28. Rigau J (1996) Acción de la luz Láser a baja intensidad en la modulación de la función celular. [Tesis doctoral]. Reus (Tarragona) Universitat Rovira i Virgili, Spain
29. Rigau T, Piedrafita J, Reverter A, Canal M, Rodríguez-Gil JE (1996) The rate of L-lactate production: a feasible parameter for the fresh diluted boar semen quality analysis. *Anim Reprod Sci* 43:161–172
30. Rigau T, Farré M, Ballester J, Mogas T, Peña A, Rodríguez-Gil JE (2001) Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology* 56:801–815
31. Rigau T, Rivera M, Palomo MJ, Mogas T, Ballester J, Peña A, Otaegui PJ, Guinovart JJ, Rodríguez-Gil JE (2002) Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. *Reproduction* 123:579–591
32. Rivera del Álamo MM (2003) Efecto del fotoperíodo sobre la calidad seminal de verracos destinados a inseminación artificial. [Tesis doctoral]. Bellaterra (Barcelona): UAB, Spain, junio 2003, pp 14–15
33. Rodríguez-Gil JE, Rigau T (1995) Effects of slight agitation on the quality of refrigerated boar semen. *Anim Reprod Sci* 39:141–146
34. Rodríguez-Gil JE, Rigau T (1996) Effects of ouabain on the response to osmotic changes in dog and boar spermatozoa. *Theriogenology* 45:873–888
35. Rodríguez-Gil JE, Montserrat A, Rigau T (1994) Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology* 42:815–829
36. Roldan ERS (1998) Signal transduction during mammalian sperm acrosomal exocytosis. In: Lauria A, Gandolfi F, Enne G, Gianaroli L (ed) *Gametes: development and function*. Serono Symposia, Rome, Italy, pp 219–228
37. Rossato M, Di Virgilio F, Rizzuto R, Galeazzi G, Foresta C (2001) Intracellular calcium store depletion and acrosome reaction in human spermatozoa: role of calcium and plasma membrane potential. *Mol Hum Reprod* 7(2):119–128
38. Troiano L, Granata AR, Cossarizza A, Kalshnikova G, Bianchi R, Pini G, Tropea F, Carani C, Franceschi C (1998) Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells, a flow cytometry analysis with implications for male infertility. *Exp Cell Res* 241: 384–393
39. Tunér J, Hode L (1999) Low level laser therapy: clinical practice and scientific background. Prima Books, Grängesberg, Sweden, pp 90–92
40. Tunér J, Hode L (2002a) Laser therapy: clinical practice and scientific background. Prima Books, Grängesberg, Sweden, pp 95–97
41. Tunér J, Hode L (2002b) Laser therapy: clinical practice and scientific background. Prima Books, Grängesberg, Sweden, pp 68–69
42. Zaneveld LJD, Polakoski KL (1977) Collection and physical examination of the ejaculate. In: Hafez ESE (ed) *Techniques of human andrology*, chap 9. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

RESPOSTA DE LA MOTILITAT ESPERMÀTICA A LA IRRADIACIÓ AMB LÀSER DE DíODE DE 655 nm D'EMISSIÓ A DIFERENTS ENERGIES I POTÈNCIES

Marc-Ignasi Corral-Baqués

ISBN/ DL:T.1240-2011

# The effect of low-level laser irradiation on dog spermatozoa motility is dependent on laser output power

M. I. Corral-Baqués · M. M. Rivera · T. Rigau ·  
J. E. Rodríguez-Gil · J. Rigau

Received: 16 May 2008 / Accepted: 23 July 2008

© Springer-Verlag London Limited 2008

**Abstract** Biological tissues respond to low-level laser irradiation and so do dog spermatozoa. Among the main parameters to be considered when a biological tissue is irradiated is the output power. We have studied the effects on sperm motility of 655 nm continuous wave diode laser irradiation at different output powers with 3.34 J (5.97 J/cm<sup>2</sup>). The second fraction of fresh dog sperm was divided into five groups: control, and four to be irradiated with an average output power of 6.8 mW, 15.4 mW, 33.1 mW and 49.7 mW, respectively. At 0 min and 45 min after irradiation, pictures were taken and a computer aided sperm analysis (CASA) performed to analyse different motility parameters. The results showed that different output powers affected dog semen motility parameters differently. The highest output power showed the most intense effects. Significant changes in the structure of the motile sperm subpopulation were linked to the different output powers used.

**Keywords** Semen quality · Low-power laser

## Introduction

Since the beginning of laser development in the 1960s, the effect of laser on biological tissues has been studied widely

and has shown that there is a biological response to low-level laser (LLL) stimulation. The majority of studies have focussed on the effects of LLL on fibroblasts [1, 2], wound healing [3, 4], and other biological structures, such as the neuromuscular junction [5]. However, these are not the only cells that respond to LLL irradiation; this extends to most of the body's tissues, including spermatozoa. Previous studies have reported that irradiation of dog sperm with continuous wave 655 nm diode laser at 4 J/cm<sup>2</sup>, 6 J/cm<sup>2</sup> and 10 J/cm<sup>2</sup> improves the speed and linear coefficient of sperm [6]. This is important, since interest in sperm conservation and manipulation has an economic impact in many fields, such as the preservation of endangered species or developments in farming, as well as in human reproduction. In this sense, any system that modulates sperm function can be applied to improve the strategies used in sperm conservation and manipulation.

Many studies have focussed on the utilisation of laser as optical tweezers to immobilise spermatozoa [7–9]. Notwithstanding, there have been very few studies concerning the effects of laser on sperm function. Marín and Velez [10] found in bovine sperm an increase in motility of 10% to 20% between 5 min and 10 min after irradiation, but there was no significant effect of laser application on sperm survival rates compared with that of the control. Unfortunately, their study does not provide enough information on the laser features or means of irradiation. Remarkably, the effects of laser irradiation seem to vary with the species studied. Thus, laser irradiation increased longevity in stored turkey semen [11]. Moreover, Zan-Bar et al. [12], working with ram and tilapia sperm found that whereas in tilapia sperm higher motility and fertility followed red light (660 nm) and white light (400–800 nm) irradiation, in ram spermatozoa both motility and fertility were slightly increased only by red light. Moreover, in both species,

---

M. I. Corral-Baqués (✉) · J. Rigau  
Post-Degree Laser Medical Study, Rovira i Virgili University,  
Reus, Spain  
e-mail: marcignasi@yahoo.co.uk

M. M. Rivera · T. Rigau · J. E. Rodríguez-Gil  
Animal Reproduction Unit, Faculty of Veterinary Medicine,  
Autonomous University of Barcelona,  
Bellaterra, Spain



irradiation with ultraviolet (UV; 294 nm) and violet (360 nm) light induced a negative effect on both motility and fertility [12]. However, other studies have not been able to show any improvement in rat sperm motility due to laser irradiation [13]. All these discrepancies clearly indicate that we are still far away from precise knowledge of the effects of LLL on spermatozoa, and many more in-depth studies will be needed to clarify this important question.

A very important parameter in the quality analysis of sperm is motility, because the role of the spermatozoon is to deliver the male's genetic material to an oocyte during fertilisation. In the past, motility has been subjected to fairly subjective analysis methods, which have precluded the collection of very precise information about sperm function. More recently, the introduction of computer assisted sperm analysis (CASA) systems has allowed more objective, sensitive and precise systems to quantify sperm motility [14, 15]. The CASA system is based on the record of sperm movement by means of a microscope and a camera, such that a variable number of digital pictures, depending on the precise CASA system utilised, can be taken in a second. Afterwards, the digital image of each spermatozoon head can be individualised and its displacement tracked through the whole sequence of images. This allows precise quantification of the movement performed for each sperm throughout the recorded time [15] (see Table 1). In this way, CASA systems have allowed the study of other aspects of sperm function that were impossible to analyse under a subjective motility analysis, such as the structure of a motile sperm subpopulation in the ejaculates of a wide range of mammals [16–21]. In this way, we have to stress that the existence of a specific structure in a motile sperm subpopulation in an ejaculate implies the concomitant existence of sperm with separate functional and physiological characteristics in the same ejaculate. Furthermore, there is strong evidence that

subpopulation changes could play an important role in the ability of an ejaculate to fertilise, at least in species such as the horse [18], indicating that the precise motile subpopulation structure is instrumental in the optimisation of the fertilising capacity of mammalian ejaculates.

Centring on the effects of LLL on sperm, the main parameters to be taken into account when a living tissue or cell are irradiated, besides the irradiation method itself, are the wavelength, output power, dose and spot. The importance of the wavelength is due to the fact that cells and tissues contain a wide variety of chromophores that absorb light in a very specific manner depending on the wavelength used. The output power is defined as  $P=E/t$ , where  $P$  is the output power,  $E$  is the energy emitted by the laser and  $t$  is the time of emission. This implies that the higher the laser output power, the shorter the time the laser will take to deliver a specific amount of energy. It is well known in the laser therapy field that power and power density (power divided by the surface area) are important. However, this importance has not been tested on the non-therapeutic use of LLL, such as the stimulation of healthy normal sperm. Dose is important, because LLL can have different types of effects: (a) none (when the dose is insufficient), (b) stimulatory or (c) inhibitory (inhibitory effects do happen when cells are irradiated by big doses) [2]. With regard to this, previous studies carried out by our investigation team have shown that laser keeps the motility features of dog sperm constant and seems to maintain its functional characteristics for at least 45 min after irradiation when a fixed 21.7 mW output power 655 nm diode laser, with doses ranging from 4 J/cm<sup>2</sup> to 10 J/cm<sup>2</sup>, was used on dog sperm [6]. Thus, and as a logical follow up, taking into account all of the above data, the aim of our study was to investigate how irradiation of 3.34 J (5.97 J/cm<sup>2</sup>) with a 655 nm diode laser at different output power levels affected dog sperm quality (motility, sperm subpopulation and function).

**Table 1** Meanings and abbreviations of motility parameters

Acronym	Name	Meaning
VCL	Curvilinear velocity	Mean frame to frame velocity; $\mu\text{m s}^{-1}$
VSL	Progressive velocity	Velocity between centroids in first and last frame tracked; $\mu\text{m s}^{-1}$
VAP	Average path velocity	Mean trajectory of the spermatozoa per unit of time; $\mu\text{m s}^{-1}$
LIN	Linear coefficient	$\text{LIN} = [\text{VSL}/\text{VCL}] \times 100; \%$
STR	Straightness	$\text{STR} = [\text{VSL}/\text{VAP}] \times 100; \%$
WOB	Wobble	$\text{WOB} = [\text{VAP}/\text{VCL}] \times 100; \%$
ALHmed	Mean amplitude of lateral head displacement	Head displacement in its curvilinear path from one side to the other of the mean path ( $\mu\text{m}$ ).
BCF	Beat cross frequency	Number of lateral oscillatory movements of the sperm head around the mean path expressed in Hertz (Hz)
MT	Total motility	Total motility calculated from a VAP over 20 $\mu\text{m s}^{-1}$ , expressed in %

## Materials and methods

### Sperm samples

Sperm was obtained by manual stimulation from beagle dogs from the experimental kennels at the Faculty of Veterinary Medicine of the Autonomous University of Barcelona. The sperm was saved in glass collectors warmed to 37°C. All three sperm fractions (pre-sperm fraction, rich fraction and prostatic fraction) were collected separately, and only the sperm-rich fraction was used in the experiments. A total of 20 ejaculates from six different dogs were used in the study. The research on the animals was done following the Law on Animal Protection for Research and Other Scientific Purposes approved by the Parliament of Catalonia on the 21st June, 1995 (5/1995).

The sperm-rich fraction was kept away from light and at a constant temperature of 37°C in polystyrene foam boxes [22]. A smear was performed to establish the sperm quality. The smear was stained with eosin–nigrosin to determine the percentage of viability, altered acrosomes and morphological abnormalities [23]. Values were determined after counting between 200 and 300 spermatozoa per sample at  $\times 1,000$  magnification.

### Laser source and irradiation procedure

The light source used was a continuous wave diode laser with a 655 nm wavelength of emission (SORISA, Barcelona, Spain) with a variable output power ranging from 5 mW to 53 mW and a 0.56 mm<sup>2</sup> spot.

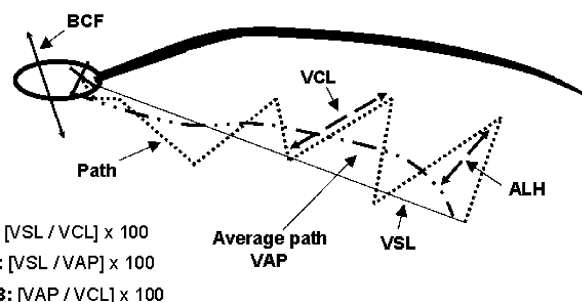
To ensure stability, we turned on the laser 15 min before the measurements were taken. Output power was measured with a high-sensitivity thermal sensor connected to a Coherent® FieldMaster/GS to calculate the irradiation time.

Each sperm sample was divided into five groups: 1 control group (P0) not to be irradiated, and four groups to be irradiated with 3.34 J (total energy) given at different mean output powers of 6.8 mW, 15.4 mW, 33.1 mW and 49.7 mW, called P1, P3, P6 and P9, respectively.

### Computer-assisted motility analysis

Aliquots of 5  $\mu$ l of semen were placed on slides, covered with 20 mm  $\times$  20 mm coverslips and placed on a 37°C-warmed platina of a phase contrast microscope connected to a high resolution video-camera. Two images of each sample were taken at a magnification of  $\times 200$  and collected with SCA2002 software (Microptic S.L., Valencia, Spain).

Images were taken at time 0 for the control and right after irradiation for the rest of the groups (time 00) and at 45 min.



$$\text{LIN: } [\text{VSL} / \text{VCL}] \times 100$$

$$\text{STR: } [\text{VSL} / \text{VAP}] \times 100$$

$$\text{WOB: } [\text{VAP} / \text{VCL}] \times 100$$

**Fig. 1** Graphical meanings of the different motility parameters studied with regard to the path covered by a spermatozoon in a given time

A total of 4,944 spermatozoa were analysed. The measurements were performed with a CASA automatic system. The motility parameters studied were: curvilinear velocity (VCL), progressive velocity (VSL), straightness (STR), wobble (WOB), average path velocity (VAP), linear coefficient (LIN), mean amplitude of lateral head displacement (ALHmed), beat cross frequency (BCF) and total motility (MT). (Table 1 shows the meanings of the abbreviations, and Fig. 1 shows the different motility parameters seen).

### Sperm function test

The hypo-osmotic swelling test (HOST) evaluates the functional capacity of spermatozoa. When spermatozoa are placed in a hypo-osmotic environment they react, when functional, by swelling and bending their tails. The percentage of swollen tails is, therefore, directly proportional to sperm quality [24–27]. For the HOST two media were used: the iso-osmotic medium (osmotic pressure  $\pi = 300 \pm 15$  mosmol) comprised 3.7% (w/v) dehydrated sodium citrate in distilled water; the hypo-osmotic medium ( $\pi = 150 \pm 20$  mosmol) contained 1.30% fructose (w/v) and 0.70% (w/v) dehydrated sodium citrate [26]. Fifteen minutes after irradiation, aliquots were made up with 100  $\mu$ l of sperm and 900  $\mu$ l of each test medium previously heated to 37°C. The mixtures were kept at 37°C for 15 min. After that, 25  $\mu$ l were then extracted so that we could examine the spermatozoa. The sample was stained with eosin–nigrosin vital dye, and bent tails in the osmotic and hypo-osmotic media were counted (up to over 200 spermatozoa per slide were counted). The percentage of bent tails was calculated by the true swollen tails (TST) test as described by Rodríguez-Gil et al. [26] as:

$$\text{TST}(\%) = ([\text{HTS} - \text{ITS}] \times \text{HV}) / \text{IV},$$

where HTS is the percentage of tail swelling in the hypo-osmotic medium, ITS is the percentage of tail swelling in the iso-osmotic medium, HV is the percentage of viable spermatozoa (as determined after trypan blue/giemsa stain-

ing) in the hypo-osmotic medium, and IV is the percentage of viable spermatozoa in the iso-osmotic medium. All parameters are expressed as percentages after 15 min incubation in the media.

### Statistical analysis

The statistical analysis was performed with the Statistical Analysis System (SAS Institute, Cary, NC, USA; 1982). We used a NORM PLOT procedure to determine which parameters followed a normal distribution. Those that did not were normalised (normalisation is a mathematical transformation of data without a normal distribution into data with a normal distribution) before the different statistical procedures were applied. All the data shown in the different tables correspond to real values in both normally and not normally distributed data. However, statistical differences among treatments were determined with the normally distributed data.

We applied the fast cluster analysis 'FASTCLUS' (statistical procedure in the statistical pack SAS) to distribute every individual motile spermatozoon into a specific subpopulation. This procedure performs a disjointed cluster analysis based on Euclidean distances computed on motility variables. Spermatozoa were divided into clusters such that every observation belonged only to a single cluster. Sperm cells that shared similar motility characteristics were assigned to the same cluster, whereas spermatozoa that differed in motility characteristics were assigned to different clusters. Then, a generalised linear model (GLM) was used to evaluate significant differences ( $P < 0.05$ ), and the least squares means (LSMEANS) procedure was applied to list these differences. These procedures, GLM and LSMEANS, were also utilised to determine the statistical differences of mean values of viability, altered acrosomes, morphological abnormalities and motility among treatments. Finally, we used a chi-square procedure to determine the percentage subpopulation distribution in every single experiment. Once the percentage distribution per experiment had been determined, we applied a Student/Neumann/Keuls test to determine and list, respectively, the differences between the different treatments. The total number of spermatozoa examined by this protocol was 4,944.

## Results

### Overall quality parameters of dog semen

Fresh dog semen was characterised by a VCL of  $123.8 \pm 0.9 \mu\text{m s}^{-1}$ , a VSL of  $78.3 \pm 0.7 \mu\text{m s}^{-1}$ , a VAP of  $90.6 \pm 0.7 \mu\text{m s}^{-1}$ , a LIN of  $63.2 \pm 0.5\%$ , a STR of  $85.2 \pm 0.5\%$ , a

WOB of  $73.5 \pm 0.5\%$ , an ALH of  $4.14 \pm 0.1 \mu\text{m}$ , a BCF of  $10.2 \pm 0.1 \text{ Hz}$  and an MT of  $90.8\%$ .

The analysis of the motile sperm subpopulations' structures showed that four different types of dog sperm subpopulations were identified in the ejaculate, based on sperm motility features. These subpopulations had the following characteristics:

- Subpopulation 1 (S1). This subpopulation comprised sperm with the lowest velocity and linearity characteristics, as indicated by values of VSL ( $41.8 \pm 1.6 \mu\text{m s}^{-1}$ ) and LIN ( $58.1 \pm 1.2\%$ ). This subpopulation comprised  $17.4 \pm 1.4\%$  of the total sperm population.
- Subpopulation 2 (S2). This subpopulation showed the second lowest VSL ( $58.6 \pm 1.5 \mu\text{m s}^{-1}$ ), and a LIN of  $40.7 \pm 1.1\%$ , and comprised  $38.7 \pm 1.4\%$  of the total sperm population.
- Subpopulation 3 (S3). This showed higher velocity parameters, defined by a VSL of  $86.2 \pm 1.1 \mu\text{m s}^{-1}$  together with the second highest LIN ( $75.0 \pm 0.8\%$ ), and comprised  $25.7 \pm 1.5\%$  of the total sperm population.
- Subpopulation 4 (S4). This showed the fastest VSL ( $126.8 \pm 1.3 \mu\text{m s}^{-1}$ ), together with the highest LIN ( $78.9 \pm 1.0\%$ ), and comprised  $18.1 \pm 1.1\%$  of the total sperm population. (See Tables 2 and 11).

### Effects of different output powers on dog sperm motility features

The observed results changed depending on both the utilised output power and the time after the moment of irradiation. The results obtained were the following:

1. Changes immediately after irradiation (Table 3):

*Output power 6.8 mW (P1)* The lowest output power significantly increased ( $P < 0.05$ ) VSL, VAP, LIN and WOB, with respect to the control, whereas ALH was reduced with respect to the control group.

*Output power 15.4 mW (P3)* The second output power significantly increased ( $P < 0.05$ ) VCL, VSL, VAP, LIN and WOB, with respect to the control.

**Table 2** Motility mean values of fresh semen subpopulations. Results are expressed as means ± standard error of the mean (SEM)

Sperm motility parameters	Subpopulation 1	Subpopulation 2	Subpopulation 3	Subpopulation 4
VCL ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	73.1±1.9	144.4±1.9	115.8±1.32	161.9±1.7
VSL ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	41.8±1.6	58.6±1.5	86.2±1.1	126.8±1.3
VAP ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	51.2±1.5	85.3±1.4	91.6±1.0	134.1±1.3
LIN (%)	58.1±1.2	40.7±1.1	75.0±0.8	78.9±1.0
STR (%)	81.7±1.1	70.4±1.1	94.1±0.8	94.5±1.0
WOB (%)	70.7±1.0	60.2±1.0	79.6±0.7	83.4±0.9
ALH ( $\mu\text{m}$ )	2.74±0.1	5.74±0.1	3.58±0.1	4.51±0.1
BCF (Hz)	8.40±0.3	43.0±0.4	11.0±0.2	12.0±0.3

*Output power 33.1 mW (P6)* The third output power significantly increased ( $P<0.05$ ) VSL, whereas the VAP and the ALH were significantly reduced, with respect to the control group.

and BCF, whereas ALH was significantly reduced, with respect to the control group.

*Output power 49.7 mW (P9)* The highest output power significantly increased ( $P<0.05$ ) VSL, LIN, STR, WOB

2. Changes 45 min after irradiation (Table 3):

*Control (P0)* The STR increased and the VAP decreased significantly ( $P<0.05$ ) with respect to time 0.

**Table 3** Evolution of the different motility parameters over time depending on the output power of irradiation. Results are expressed as means ± standard error of the mean (SEM). *t0* before irradiation, *t00*

right after irradiation, *t45* 45 min after irradiation, *P0* control, *P1* 6.8 mW, *P3* 15.4 mW, *P6* 33.1 mW, *P9* 49.7 mW

	t	P0	P1	P3	P6	P9
VCL ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	t0	123.8±0.9	123.8±0.86	123.80±0.9 <sup>a</sup>	123.8±0.9	123.8±0.9
	t00	123.8±0.9	124.3±0.9	132.0±1.0 <sup>b</sup>	116.7±0.9	121.6±1.3
	t45	124.1±0.9	122.6±0.9	128.2±0.9 <sup>b</sup>	122.5±0.9	123.9±1.2
VSL ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	t0	78.3±0.7	78.3±0.7 <sup>a</sup>	78.3±0.7 <sup>a</sup>	78.3±0.7 <sup>a</sup>	78.3±0.7 <sup>a</sup>
	t00	78.3±0.7	85.1±0.8 <sup>b</sup>	86.8±0.8 <sup>b</sup>	76.9±0.7 <sup>a</sup>	84.4±1.0 <sup>b</sup>
	t45	78.0±0.7	78.5±0.8 <sup>a</sup>	85.9±0.8 <sup>b</sup>	82.2±0.8 <sup>b</sup>	87.1±1.0 <sup>b</sup>
VAP ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	t0	90.5±0.7 <sup>a</sup>	90.6±0.7 <sup>a</sup>	90.6±0.7 <sup>a</sup>	90.6±0.7 <sup>a</sup>	90.6±0.7 <sup>a</sup>
	t00	90.5±0.7 <sup>a</sup>	96.7±0.7 <sup>b</sup>	101.6±0.8 <sup>b</sup>	86.6±0.7 <sup>b</sup>	93.0±1.0 <sup>a</sup>
	t45	87.2±0.7 <sup>b</sup>	90.6±0.7 <sup>a</sup>	96.7±0.7 <sup>c</sup>	92.1±0.7 <sup>a</sup>	95.4±1.0 <sup>b</sup>
LIN (%)	t0	63.2±0.5	63.2±0.5 <sup>a</sup>	63.2±0.5 <sup>a</sup>	63.2±0.5 <sup>a</sup>	63.2±0.5 <sup>a</sup>
	t00	63.2±0.5	67.4±0.6 <sup>b</sup>	65.9±0.6 <sup>b</sup>	65.1±0.6 <sup>ab</sup>	69.3±0.8 <sup>b</sup>
	t45	63.8±0.5	65.2±0.6 <sup>a</sup>	67.2±0.6 <sup>b</sup>	66.4±0.6 <sup>b</sup>	69.8±0.8 <sup>b</sup>
STR (%)	t0	85.2±0.5 <sup>a</sup>	85.2±0.5	85.2±0.5 <sup>ab</sup>	85.2±0.5 <sup>a</sup>	85.2±0.5 <sup>a</sup>
	t00	85.2±0.5 <sup>a</sup>	86.3±0.5	84.6±0.6 <sup>a</sup>	87.1±0.5 <sup>b</sup>	89.4±0.7 <sup>b</sup>
	t45	88.0±0.5 <sup>b</sup>	86.1±0.6	87.3±0.6 <sup>b</sup>	88.2±0.6 <sup>b</sup>	90.2±0.7 <sup>b</sup>
WOB (%)	t0	73.5±0.5	73.5±0.5 <sup>a</sup>	73.5±0.5 <sup>a</sup>	73.5±0.5	73.5±0.5 <sup>a</sup>
	t00	73.5±0.5	77.3±0.5 <sup>b</sup>	77.1±0.5 <sup>b</sup>	74.2±0.5	76.6±0.7 <sup>b</sup>
	t45	71.4±0.5	74.8±0.5 <sup>a</sup>	76.1±0.5 <sup>b</sup>	74.5±0.5	76.8±0.7 <sup>b</sup>
ALH ( $\mu\text{m}$ )	t0	4.14±0.1	4.14±0.1 <sup>a</sup>	4.1±0.1	4.14±0.1 <sup>a</sup>	4.14±0.1 <sup>a</sup>
	t00	4.14±0.1	3.86±0.1 <sup>b</sup>	4.0±0.1	3.81±0.1 <sup>b</sup>	3.69±0.1 <sup>b</sup>
	t45	4.27±0.1	4.03±0.1 <sup>ab</sup>	4.1±0.1	4.00±0.1 <sup>ab</sup>	3.67±0.1 <sup>b</sup>
BCF (Hz)	t0	10.2±0.1	10.2±0.1	10.2±0.1	10.2±0.1	10.2±0.1 <sup>a</sup>
	t00	10.2±0.1	10.2±0.2	10.5±0.2	10.6±0.2	11.3±0.2 <sup>b</sup>
	t45	10.7±0.1	10.4±0.2	10.6±0.2	10.5±0.2	11.4±0.2 <sup>b</sup>
MT (%)	t0	92.3±6.3	92.3±6.3	92.3±6.3	92.3±6.3	92.3±6.3
	t00	92.3±6.3	89.4±8.4	87.9±8.0	92.1±6.2	92.5±4.8
	t45	88.7±10.6	90.3±6.4	90.4±6.4	91.5±5.9	93.8±6.7

Each parameter forms an independent group with each output power. Each independent group comprises three different measurements (t0, t00, t45). Superscript letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ) between these three measurements (values with the same letter are not significantly different, whilst those with different letters are)

**Table 4** Variation of the VCL ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ) in each subpopulation over time with regard to the different output powers of irradiation. Results are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). *t0* before irradiation, *t00* right after irradiation, *t45* 45 min after irradiation, *P0* control, *P1* 6.8 mW, *P3* 15.4 mW, *P6* 33.1 mW, *P9* 49.7 mW

VCL Subpopulation	t	P0	P1	P3	P6	P9
1	0	73.1 $\pm$ 1.9	73.1 $\pm$ 1.9	73.1 $\pm$ 1.9	73.1 $\pm$ 1.9	73.1 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>
	00	73.1 $\pm$ 1.9	70.3 $\pm$ 2.2	81.0 $\pm$ 1.9	71.0 $\pm$ 1.8	125.1 $\pm$ 3.5 <sup>b</sup>
	45	64.9 $\pm$ 1.7	66.1 $\pm$ 2.3	79.7 $\pm$ 1.4	68.2 $\pm$ 1.8	79.6 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>
2	0	144.4 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	144.4 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	144.4 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	144.4 $\pm$ 1.9	144.4 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>
	00	144.4 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	141.9 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	157.4 $\pm$ 2.5 <sup>b</sup>	137.2 $\pm$ 2.0	78.6 $\pm$ 2.4 <sup>b</sup>
	45	163.1 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>	158.9 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>	151.3 $\pm$ 2.2 <sup>ab</sup>	140.1 $\pm$ 2.3	138.0 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>
3	0	115.8 $\pm$ 1.3	115.8 $\pm$ 1.3 <sup>ab</sup>	115.8 $\pm$ 1.3	115.8 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	115.8 $\pm$ 1.3
	00	115.8 $\pm$ 1.3	121.4 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	123.2 $\pm$ 1.4	105.2 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	119.3 $\pm$ 1.7
	45	112.7 $\pm$ 1.3	111.7 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	121.4 $\pm$ 1.5	120.2 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	118.0 $\pm$ 1.5
4	0	161.9 $\pm$ 1.7	161.9 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	161.9 $\pm$ 1.7	161.9 $\pm$ 1.7	161.9 $\pm$ 1.7
	00	161.9 $\pm$ 1.7	163.8 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	166.3 $\pm$ 1.9	153.5 $\pm$ 1.8	163.4 $\pm$ 2.3
	45	155.8 $\pm$ 1.8	153.7 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	160.5 $\pm$ 2.3	161.2 $\pm$ 2.0	159.9 $\pm$ 2.7

Each subpopulation forms an independent group with each output power. Each independent group is constituted by three different measurements (*t0*, *t00*, *t45*). Superscript letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between these three measurements (values with the same letter are not significantly different, whilst those with different letters are)

*Output power 6.8 mW (P1)* This had not significantly affected ( $P < 0.05$ ) any motility parameter 45 min after irradiation when compared with the control at time 0.

*Output power 15.4 mW (P3)* Irradiation significantly increased ( $P < 0.05$ ) the values of the VCL, VSL, VAP, LIN and WOB when compared with the control at time 0.

*Output power 33.1 mW (P6)* The third output power 45 min after irradiation significantly increased ( $P < 0.05$ )

the values of the VSL, LIN and STR when compared with the control at time 0.

*Output power 49.7 mW (P9)* This significantly increased ( $P < 0.05$ ) the values of the VSL, VAP, LIN, STR, WOB and BCF, whereas it reduced the ALH significantly ( $P < 0.05$ ) when compared with the control at time 0.

Finally, there were no significant changes in the values of the HOST in any of the conditions studied (data not shown)

**Table 5** Variation of the VSL ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ) in each subpopulation over time with regard to the different output powers of irradiation. Results are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). *t0* before irradiation, *t00* right after irradiation, *t45* 45 min after irradiation, *P0* control, *P1* 6.8 mW, *P3* 15.4 mW, *P6* 33.1 mW, *P9* 49.7 mW

VSL Subpopulation	t	P0	P1	P3	P6	P9
1	0	41.8 $\pm$ 1.6	41.8 $\pm$ 1.6	41.8 $\pm$ 1.6	41.8 $\pm$ 1.6	41.8 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>
	00	41.8 $\pm$ 1.6	41.3 $\pm$ 1.8	49.9 $\pm$ 1.5	36.7 $\pm$ 1.5	53.8 $\pm$ 2.8 <sup>ab</sup>
	45	37.6 $\pm$ 1.4	39.4 $\pm$ 1.8	48.5 $\pm$ 1.1	41.4 $\pm$ 1.5	51.3 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>
2	0	58.6 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	58.6 $\pm$ 1.5	58.6 $\pm$ 1.5	58.6 $\pm$ 1.5	58.6 $\pm$ 1.5
	00	58.6 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	65.7 $\pm$ 1.7	63.6 $\pm$ 2.0	66.9 $\pm$ 1.6	56.8 $\pm$ 1.9
	45	67.7 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	65.7 $\pm$ 1.8	63.1 $\pm$ 1.8	62.3 $\pm$ 1.9	66.0 $\pm$ 2.5
3	0	86.2 $\pm$ 1.1	86.2 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	86.2 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	86.2 $\pm$ 1.1	86.2 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>
	00	86.2 $\pm$ 1.1	96.8 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	95.3 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	81.0 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	93.6 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>
	45	83.3 $\pm$ 1.1	83.0 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	96.9 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	92.3 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	94.2 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>
4	0	126.8 $\pm$ 1.3	126.8 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	126.8 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	126.8 $\pm$ 1.3 <sup>ab</sup>	126.8 $\pm$ 1.3
	00	126.8 $\pm$ 1.3	136.7 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	138.6 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	122.9 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	133.1 $\pm$ 1.9
	45	123.5 $\pm$ 1.5	126.0 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	135.1 $\pm$ 1.8 <sup>ab</sup>	132.8 $\pm$ 1.6 <sup>b</sup>	136.8 $\pm$ 2.2

Each subpopulation forms an independent group with each output power. Each independent group comprises three different measurements (*t0*, *t00*, *t45*). Superscript letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between these three measurements (values with the same letter are not significantly different, whilst those with different letters are)

**Table 6** Variation of the VAP ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ) in each subpopulation over time with regard to the different output powers of irradiation. Results are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). *t*0 before irradiation, *t*00 right after irradiation, *t*45 45 min after irradiation, *P*0 control, *P*1 6.8 mW, *P*3 15.4 mW, *P*6 33.1 mW, *P*9 49.7 mW

VAP Subpopulation	t	P0	P1	P3	P6	P9
1	0	51.2 $\pm$ 1.5	51.2 $\pm$ 1.5	51.2 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	51.2 $\pm$ 1.5	51.2 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>
	00	51.2 $\pm$ 1.5	49.2 $\pm$ 1.7	57.7 $\pm$ 1.4 <sup>ab</sup>	47.8 $\pm$ 1.4	76.0 $\pm$ 2.7 <sup>b</sup>
	45	44.4 $\pm$ 1.3	46.5 $\pm$ 1.8	58.7 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	46.5 $\pm$ 1.4	56.1 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
2	0	85.3 $\pm$ 1.4	85.3 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	85.3 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	85.3 $\pm$ 1.4	85.3 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>
	00	85.3 $\pm$ 1.4	94.1 $\pm$ 1.6 <sup>b</sup>	105.4 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>	85.9 $\pm$ 1.6	60.9 $\pm$ 1.9 <sup>b</sup>
	45	87.7 $\pm$ 1.6	96.6 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	86.3 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	86.8 $\pm$ 1.8	86.2 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>
3	0	91.6 $\pm$ 1.0	91.6 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	91.6 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	91.6 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	91.6 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>
	00	91.6 $\pm$ 1.0	101.9 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	100.2 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	85.2 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	97.9 $\pm$ 3.0 <sup>ab</sup>
	45	88.4 $\pm$ 1.0	88.5 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	102.2 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	96.9 $\pm$ 1.1	98.1 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>
4	0	134.1 $\pm$ 1.3	134.1 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	134.1 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	134.1 $\pm$ 1.3 <sup>ab</sup>	134.1 $\pm$ 1.3
	00	134.1 $\pm$ 1.3	141.3 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	143.1 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	127.5 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	137.3 $\pm$ 1.8
	45	128.4 $\pm$ 1.4	130.8 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	139.6 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	138.3 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	141.3 $\pm$ 2.1

Each subpopulation forms an independent group with each output power. Each independent group comprises three different measurements (*t*0, *t*00, *t*45). Superscript letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between these three measurements (values with the same letter are not significantly different, whilst those with different letters are)

### Effects of different output power on dog sperm subpopulations

Again, the irradiation of dog sperm with 3.34 J at different output powers induced separate effects, depending on both the output power utilised and the time after irradiation. The results obtained were the following (Tables 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10):

#### 1. Changes immediately after irradiation:

**Output power 6.84 mW (P1)** The lowest output power significantly affected ( $P < 0.05$ ) mainly S3 (in VSL, VAP, LIN and WOB) and, in two cases, S2 and S3, but in no case

did it affect the slowest subpopulation (S1) in any of the motility parameters studied. Values were increased in all the parameters affected.

**Output power 15.4 mW (P3)** As in P1, all differences seen after irradiation with the second lowest output power significantly affected S2, S3 and S4, but not S1. In the different motility parameters, apart from STR, all the affected parameters were increased in value.

**Output power 33.1 mW (P6)** All differences seen with the third output power significantly affected ( $P < 0.05$ ) only

**Table 7** Variation of the LIN (%) in each subpopulation over time with regard to the different output powers of irradiation. Results are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). *t*0 before irradiation, *t*00 right after irradiation, *t*45 45 min after irradiation, *P*0 control, *P*1 6.8 mW, *P*3 15.4 mW, *P*6 33.1 mW, *P*9 49.7 mW

LIN Subpopulation	t	P0	P1	P3	P6	P9
1	0	58.1 $\pm$ 1.2	58.1 $\pm$ 1.2	58.1 $\pm$ 1.2	58.1 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup>	58.1 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>
	00	58.1 $\pm$ 1.2	59.0 $\pm$ 1.4	61.9 $\pm$ 1.1	53.4 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	42.9 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>
	45	58.9 $\pm$ 1.1	61.9 $\pm$ 1.4	61.7 $\pm$ 0.9	60.4 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	64.9 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>
2	0	40.7 $\pm$ 1.1	40.7 $\pm$ 1.1	40.7 $\pm$ 1.1	40.7 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	40.7 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>
	00	40.7 $\pm$ 1.1	46.4 $\pm$ 1.3	40.3 $\pm$ 1.6	48.9 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	72.7 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>
	45	41.9 $\pm$ 1.3	41.1 $\pm$ 1.4	42.1 $\pm$ 1.4	44.9 $\pm$ 1.4 <sup>ab</sup>	48.4 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>
3	0	75.0 $\pm$ 0.8	75.0 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	75.0 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	75.0 $\pm$ 0.8	75.0 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>
	00	75.0 $\pm$ 0.8	80.2 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	77.8 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	77.4 $\pm$ 0.9	79.3 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>
	45	74.6 $\pm$ 0.8	74.9 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	80.3 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	77.2 $\pm$ 0.9	80.1 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>
4	0	78.9 $\pm$ 1.0	78.9 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	78.9 $\pm$ 1.0	78.9 $\pm$ 1.0	78.9 $\pm$ 1.0
	00	78.9 $\pm$ 1.0	83.9 $\pm$ 1.0 <sup>ab</sup>	83.6 $\pm$ 1.2	80.7 $\pm$ 1.1	82.2 $\pm$ 1.4
	45	79.9 $\pm$ 1.1	82.8 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	84.7 $\pm$ 1.4	82.8 $\pm$ 1.2	85.6 $\pm$ 1.7

Each subpopulation forms an independent group with each output power. Each independent group comprises three different measurements (*t*0, *t*00, *t*45). Superscript letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between these three measurements (numbers with the same letter are not significantly different, whilst those with different letters are)

**Table 8** Variation of the STR (%) in each subpopulation over time with regard to the different output powers of irradiation. Results are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). *t*0 before irradiation, *t*00 right after irradiation, *t*45 45 min after irradiation, *P*0 control, *P*1 6.8 mW, *P*3 15.4 mW, *P*6 33.1 mW, *P*9 49.7 mW

STR Subpopulation	T	P0	P1	P3	P6	P9
1	0	81.7 $\pm$ 1.1	81.7 $\pm$ 1.1	81.7 $\pm$ 1.1	81.7 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	81.7 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>
	00	81.7 $\pm$ 1.1	81.8 $\pm$ 1.3	85.1 $\pm$ 1.1	78.0 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	72.3 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>
	45	83.6 $\pm$ 1.0	85.1 $\pm$ 1.3	82.8 $\pm$ 0.8	87.8 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	90.3 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>
2	0	70.4 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	70.4 $\pm$ 1.1	70.4 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	70.4 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	70.4 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>
	00	70.4 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	71.7 $\pm$ 1.2	61.7 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	79.2 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	92.8 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>
	45	77.9 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	69.4 $\pm$ 1.3	74.6 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	73.7 $\pm$ 1.4 <sup>ab</sup>	77.9 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>
3	0	94.1 $\pm$ 0.8	94.1 $\pm$ 0.8	94.9 $\pm$ 0.8	94.1 $\pm$ 0.	94.01 $\pm$ 0.8
	00	94.1 $\pm$ 0.8	95.0 $\pm$ 0.8	95.0 $\pm$ 0.8	94.9 $\pm$ 0.9	95.6 $\pm$ 1.0
	45	94.3 $\pm$ 0.8	93.8 $\pm$ 0.8	94.9 $\pm$ 0.9	95.3 $\pm$ 0.8	96.0 $\pm$ 0.9
4	0	94.5 $\pm$ 1.0	94.5 $\pm$ 1.0	94.5 $\pm$ 1.0	94.5 $\pm$ 1.0	94.5 $\pm$ 1.0
	00	94.5 $\pm$ 1.0	96.7 $\pm$ 0.9	96.8 $\pm$ 1.1	96.3 $\pm$ 1.0	96.9 $\pm$ 1.3
	45	96.2 $\pm$ 1.1	96.3 $\pm$ 0.9	96.7 $\pm$ 1.3	95.9 $\pm$ 1.1	96.8 $\pm$ 1.6

Each subpopulation forms an independent group with each output power. Each independent group comprises three different measurements (*t*0, *t*00, *t*45). Superscript letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between these three measurements (numbers with the same letter are not significantly different, whilst those with different letters are)

different parameters in S2 and S3, the values of the affected S2 (LIN and STR) being increased, and the VCL, VAP and ALH of S3 being reduced in value.

*Output power 49.7 mW (P9)* The highest output power was the only output power that significantly affected ( $P < 0.05$ ) mainly S1 and S2; S3 was only affected in the VCL, and in no case was S4 affected in any motility parameter studied. Values were increased for S1 in VCL, VAP and ALH, whereas they were reduced in LIN and

WOB; S2 values were increased for the LIN, STR and WOB, whereas they were reduced for the VCL, VAP and ALH.

2. Changes 45 min after irradiation (Tables 5, 6, 7, 8, 9, 10):

*Control (P0)* It showed significant changes only in S2, which presented an increase in the VSL and STR values and a decrease in the VCL values. No other subpopulation was affected.

**Table 9** Variation of the WOB (%) in each subpopulation over time with regard to the different output powers of irradiation. Results are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). *t*0 before irradiation, *t*00 right after irradiation, *t*45 45 min after irradiation, *P*0 control, *P*1 6.8 mW, *P*3 15.4 mW, *P*6 33.1 mW, *P*9 49.7 mW

WOB Subpopulation	T	P0	P1	P3	P6	P9
1	0	70.7 $\pm$ 1.0	70.7 $\pm$ 1.0	70.7 $\pm$ 1.0	70.7 $\pm$ 1.0	70.7 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>
	00	70.7 $\pm$ 1.0	71.1 $\pm$ 1.2	71.9 $\pm$ 1.0	68.6 $\pm$ 1.0	60.6 $\pm$ 1.9 <sup>b</sup>
	45	69.4 $\pm$ 0.9	71.6 $\pm$ 1.2	74.3 $\pm$ 0.8	68.2 $\pm$ 1.0	71.5 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>
2	0	60.2 $\pm$ 1.0	60.2 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	60.2 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	60.2 $\pm$ 1.0	60.2 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>
	00	60.2 $\pm$ 1.0	67.1 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	68.3 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	63.0 $\pm$ 1.1	78.1 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>
	45	54.5 $\pm$ 1.1	61.9 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup>	58.1 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	62.5 $\pm$ 1.2	63.9 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>
3	0	79.6 $\pm$ 0.7	79.6 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	79.6 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	79.6 $\pm$ 0.7	79.6 $\pm$ 0.7
	00	79.6 $\pm$ 0.7	84.4 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	81.9 $\pm$ 0.7 <sup>ab</sup>	81.4 $\pm$ 0.8	82.8 $\pm$ 0.9
	45	78.9 $\pm$ 0.7	79.8 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	84.6 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	81.0 $\pm$ 0.8	83.4 $\pm$ 0.8
4	0	83.4 $\pm$ 1.0	83.4 $\pm$ 0.9	83.4 $\pm$ 0.9	83.4 $\pm$ 0.9	83.4 $\pm$ 0.9
	00	83.4 $\pm$ 1.0	86.7 $\pm$ 0.8	86.3 $\pm$ 1.0	83.7 $\pm$ 1.0	84.7 $\pm$ 1.2
	45	283.0 $\pm$ 1.0	85.8 $\pm$ 0.8	87.5 $\pm$ 1.2	86.3 $\pm$ 1.1	88.4 $\pm$ 1.5

Each subpopulation forms an independent group with each output power. Each independent group comprises three different measurements (*t*0, *t*00, *t*45). Superscript letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between these three measurements (numbers with the same letter are not significantly different whilst those with different letters are)

**Table 10** Variation of the ALH ( $\mu\text{m}$ ) in each subpopulation over time with regard to the different output powers of irradiation. Results are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). *t0* before irradiation, *t00* right after irradiation, *t45* 45 min after irradiation, *P0* control, *P1* 6.8 mW, *P3* 15.4 mW, *P6* 33.1 mW, *P9* 49.7 mW

ALH Subpopulation	T	P0	P1	P3	P6	P9
1	0	2.74 $\pm$ 0.1	2.74 $\pm$ 0.1	2.74 $\pm$ 0.1	2.74 $\pm$ 0.1	2.74 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
	00	2.74 $\pm$ 0.1	2.69 $\pm$ 0.1	2.83 $\pm$ 0.1	2.73 $\pm$ 0.1	4.71 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
	45	2.54 $\pm$ 0.1	2.55 $\pm$ 0.1	2.77 $\pm$ 0.1	2.57 $\pm$ 0.1	2.72 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
2	0	5.74 $\pm$ 0.1	5.74 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>	5.74 $\pm$ 0.1	5.74 $\pm$ 0.1	5.74 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
	00	5.74 $\pm$ 0.1	5.23 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	5.46 $\pm$ 0.2	5.16 $\pm$ 0.1	2.60 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
	45	6.62 $\pm$ 0.1	6.13 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	6.17 $\pm$ 0.1	5.63 $\pm$ 0.1	4.91 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
3	0	3.58 $\pm$ 0.1	3.58 $\pm$ 0.1	3.58 $\pm$ 0.1	3.58 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	3.58 $\pm$ 0.1
	00	3.58 $\pm$ 0.1	3.41 $\pm$ 0.1	3.48 $\pm$ 0.1	3.16 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	3.32 $\pm$ 0.1
	45	3.44 $\pm$ 0.1	3.41 $\pm$ 0.1	3.35 $\pm$ 0.1	3.56 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	13.26 $\pm$ 0.1
4	0	4.51 $\pm$ 0.1	4.51 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	4.51 $\pm$ 0.1	4.51 $\pm$ 0.1	4.51 $\pm$ 0.1
	00	4.51 $\pm$ 0.1	4.11 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>	4.15 $\pm$ 0.1	4.19 $\pm$ 0.1	4.13 $\pm$ 0.1
	45	4.47 $\pm$ 0.1	4.02 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	3.96 $\pm$ 0.1	4.23 $\pm$ 0.1	3.78 $\pm$ 0.2

Each subpopulation forms an independent group with each output power. Each independent group comprises three different measurements (*t0*, *t00*, *t45*). Superscript letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between these three measurements (numbers with the same letter are not significantly different, whilst those with different letters are)

**Output power 6.8 mW (P1)** The lowest output power significantly affected ( $P < 0.05$ ) only S2 and S4. S2 showed an increase in VCL, VAP and ALH values. S4 showed an increase in LIN values and a decrease in ALH.

**Output power 15.4 mW (P3)** The second lowest output power significantly increased ( $P < 0.05$ ) VAP in S1 and VSL, VAP, LIN and WOB in S3.

**Output power 33.1 mW (P6)** The third output power significantly increased ( $P < 0.05$ ) STR in S1 and VSL in S3.

**Output power 49.7 mW (P9)** The highest output power significantly increased ( $P < 0.05$ ) VSL, STR and BCF values in S1 (data not shown), and VSL, VAP and LIN in S3.

Effects of laser treatment of the specific percentage of sperm included in each motile sperm subpopulation

P0 at time zero had a predominance of S2, followed by S3, S4 and S1, respectively. More than 50% of spermatozoa were in S1 and S2; 45 min later there was a shift to S3 and S4, where over 50% of spermatozoa were found. Significantly ( $P < 0.05$ ), S1 decreased, as did S2, while S4 increased more than double its percentage (Table 11).

As in the other parameters studied, laser irradiation had an immediate effect on the distribution of the sperm subpopulations. Right after irradiation P1, P3 and P6 output powers caused spermatozoa to shift to, the fastest subpopulations, especially P3, which significantly increased ( $P < 0.05$ ) S4 (by three times); in those three groups over 50% of spermatozoa

**Table 11** Percentage of subpopulations at time 0 for the control, right after the irradiation (00) and 45 min after, depending on the output power. Results are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM)

Subpopulation	p0		p1		p3		p6		p9	
	0	45	00	45	00	45	00	45	00	45
1	17.4 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	14.4 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	14.3 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	13.4 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	22.1 $\pm$ 1.5 <sup>c</sup>	31.4 $\pm$ 2.1 <sup>d</sup>	20.2 $\pm$ 1.2 <sup>ac</sup>	23.1 $\pm$ 1.5 <sup>c</sup>	41.9 $\pm$ 2.1 <sup>e</sup>	11.9 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>
2	38.7 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	23.8 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	15.7 $\pm$ 1.3 <sup>c</sup>	14.1 $\pm$ 1.1 <sup>c</sup>	23.5 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	20.5 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	20.1 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	40.9 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	11.2 $\pm$ 1.2 <sup>d</sup>	49.0 $\pm$ 2.5 <sup>e</sup>
3	25.7 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	22.5 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	40.9 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	38.2 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	12.5 $\pm$ 0.9 <sup>c</sup>	13.9 $\pm$ 1.7 <sup>c</sup>	35.7 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	21.7 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	21.0 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	20.9 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
4	18.1 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	39.2 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	29.1 $\pm$ 1.8 <sup>c</sup>	34.3 $\pm$ 1.3 <sup>d</sup>	41.8 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	34.2 $\pm$ 1.6 <sup>d</sup>	23.9 $\pm$ 1.3 <sup>c</sup>	14.3 $\pm$ 0.7 <sup>f</sup>	25.8 $\pm$ 2.3 <sup>c</sup>	18.1 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>

Significant differences ( $P < 0.05$ ) are marked by superscript letters comparing how the subpopulation percentage in each subpopulation depends on the time and the output power (values with the same letter are not significantly different, whilst those with different letters are)



were concentrated in S3 and S4, as happened in the control group P0 at time 45 min. On the other hand, P9 significantly increased ( $P < 0.05$ ) S1; in this case over 50% of spermatozoa were concentrated in S1 and S2 (Table 11).

The output power P1, 45 min after irradiation, maintained the same subpopulation percentage values as right after irradiation, except those for S4, which were significantly ( $P < 0.05$ ) higher; The sperm responded to P3 output power in almost the same way, except that was S1 increased significantly ( $P < 0.05$ ) 45 min after irradiation, whilst P6 and P9 had not kept the same subpopulation distribution 45 min after irradiation. Forty-five minutes after irradiation, P9 showed the same order of subpopulation percentage as P0 at time 0, that is, in increasing order of percentage subpopulation: S1, S4, S3 and S2.

Groups P1 and P3, 45 min after irradiation, showed a similar subpopulation distribution to that of the control group P0 at time 45, where more than 50% of the spermatozoa were in S3 and S4 (Table 11).

## Discussion

Our results clearly indicated that the effect of laser irradiation on dog sperm was seen right after irradiation. These results are similar to those previously published [6] and indicate that laser radiation has at least two separate effects on sperm, both short term and long term (45 min after irradiation), which depend on the output power used, whilst P3, P6 and P9 showed many differences when compared with the control at time 0 (see Table 3). P1 showed no difference from the control at 45 min.

Another important conclusion that can be extracted for our results is that the use of different output powers to irradiate dog semen with a given energy had different effects on spermatozoa. In both cases, right after irradiation and 45 min later, the power that showed the greater number of differences was an average output power of 49.7 mW (P9), where, right after irradiation, six parameters had been changed, and, 45 min after irradiation, seven parameters had been changed. The output power that showed a higher effect on sperm subpopulations was P9, right after irradiation and 45 min later; more subpopulations, up to 12 subpopulations of different motility parameters, had been changed right after irradiation, and six had been changed 45 min after irradiation. At both 0 min and 45 min after irradiation, 6.8 mW output power (P1) maintained the control group characteristics.

The existence of four motile sperm subpopulations that coexist in dog sperm ejaculates is a feature similar to those already reported for other mammalian species, such as boar [16, 18, 19, 21], gazelle [16], horse [18] and rabbit [20]. However, the findings in this study contradict a previous study on dog sperm by Núñez-Martínez et al. [28], who

found 11 different subpopulations in fresh sperm and nine in frozen-thawed samples. It is possible that the latter study utilised a statistical procedure in which subpopulation division showed too much overlap [considering standard deviation (SD)] among the subpopulations found. This would explain the differences when this study is compared with all the other previously published ones, thus stressing the importance of the specific statistical analysis utilised in these studies.

It is known that in certain laser applications energy delivery time is important, because there has to be enough time for the cell to obtain more essential metabolites from the medium needed for the reactions where laser irradiation is involved in. This happens in photodynamic therapy (PDT), where the presence of oxygen is needed for the production of an oxygen singlet ( $^1O_2$ ). Given the case that the same energy, in this case 3.34 J, delivered at different speeds produces different effects, it may indicate that its mechanisms of action may be involved in metabolic reactions dependent on intermediary metabolites. Zan-Bar et al. [12] proposed that the response to various sources of light might be explained by the different amounts of reactive oxygen species (ROS) formation in each species.

Amat et al. [29] proposed that the mechanism of action in LLL is based on the electromagnetic field generated by the laser beam. Likewise, the greater the power, the bigger the resulting electromagnetic field generated by that laser beam. It is possible, therefore, that the bigger electromagnetic field generated by the higher power used in our experiment might have been the reason why that power, rather than the other output powers, was responsible for a greater number of significant changes compared with the control.

With regard to the effects of LLL on sperm motility, there are still many parameters to be considered which are important for motility as well as sperm subpopulation. Mechanisms of action should also be studied so that we can understand better the interaction of LLL with sperm. Notwithstanding this, it is important to stress that the extrapolation obtained in this study must be performed on other species with the maximum care, since the functional and physiological characteristics and, hence, the ability to react against LLL, will vary greatly among mammals.

## Conclusions

Different output powers to apply 3.34 J ( $5.97 \text{ J/cm}^2$ ) to dog semen with a 655 nm continuous wave diode laser do affect spermatozoa differently. In this and all our previous experiments [6] the effects of low-level laser are seen right after irradiation, and changes are also seen 45 min later. Dog sperm irradiated with the lowest output power (6.84 mW average) was the only group that had kept the

same motility parameters 45 min after irradiation when compared with the control mean values at time 0. However, right after irradiation, the output power that caused more changes overall was 49.7 mW, which significantly increased the mean values of the progressive velocity (VSL), average path velocity (VAP), linear coefficient (LIN), straightness (STR), wobble (WOB) and beat cross frequency (BCF) and reduced the mean amplitude of lateral head displacement (ALH) with respect to the control. In addition, subpopulations were affected differently, depending on the output power, and changes could be seen right after irradiation and 45 min later at all the different output powers used.

**Acknowledgements** We would like to thank SORISA for providing us with the laser and the power meter equipment.

## References

- Almeida Lopes L, Rigau J, Amaro Zângaro R, Guidugli Neto J, Martins Marques Jaeger M (2001) Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med* 29:179–184. doi:10.1002/lsm.1107
- Hawkins D, Abrahamse H (2006) Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg* 24:705–714. doi:10.1089/pho.2006.24.705
- Demidova-Rice TN, Salomatina EV, Yaroslavsky AN, Herman IM, Hamblin MR (2007) Low-level light stimulates excisional wound healing in mice. *Lasers Surg Med* 39:706–715. doi:10.1002/lsm.20549
- Corazza AV, Jorge J, Kurachi C, Bagnato VS (2007) Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. *Photomed Laser Surg* 25:102–106. doi:10.1089/pho.2006.2011
- Nicolau RA, Martínez MS, Rigau J, Tomas J (2004) Effect of low power 655 nm diode laser irradiation on the neuromuscular junctions of the mouse diaphragm. *Lasers Surg Med* 34:277–284
- Corral-Baqués MI, Rigau T, Rivera MM, Rodríguez-Gil JE, Rigau J (2005) Effect of 655 nm diode laser on dog sperm motility. *Lasers Med Sci* 20:28–34. doi:10.1007/s10103-005-0332-3
- Mushayandebvu T, Magier T, Murnick T, Bonder T, Weiss G, Colon J (1995) Sperm membrane response to hypo-osmotic challenge after laser optical trapping at high power. *J Soc Gynecol Investig* 2:370. doi:10.1016/1071-5576(95)94567-E
- Ebner T, Moser M, Yaman C, Sommergruber M, Tews G (2002) Successful birth after laser assisted immobilization of spermatozoa before intracytoplasmic injection. *Fertil Steril* 78:417–418. doi:10.1016/S0015-0282(02)03208-9
- Nascimento JM, Shi LZ, Meyers S, Gagneux P, Loskutoff NM, Botvinick EL, Berns MW (2008) The use of optical tweezers to study sperm competition and motility in primates. *J R Soc Interface* 5:297–302 doi:10.1098/rsif.2007.1118
- Marín ML, Velez JR (1990) Efectos de la irradiación laser Helio Neon en semen bovino (minor thesis), Antioquia (Medellín), Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad de Antioquia
- Iaffaldano N, Meluzzi A, Manchisi A, Passarella S (2005) Improvement of stored turkey semen quality as a result of He-Ne laser irradiation. *Anim Reprod Sci* 85(4):317–325
- Zan-Bar T, Bartoov B, Segal R, Yehuda R, Lavi R, Lubart R, Avtalion RR (2005) Influence of visible light and ultraviolet irradiation on motility and fertility of mammalian and fish sperm. *Photomed Laser Surg* 23:549–555. doi:10.1089/pho.2005.23.549
- Lubart R, Breitbart H, Sofer Y, Cohen N, Friedmann H, Lavie R (2003) Light irradiation of sperm cells stimulates in-vitro fertilization, Joint International Laser Conference, Edinburgh (Scotland), pp 21–23
- Holt W, Watson P, Curry M, Holt C (1994) Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different systems in a practical workshop. *Fertil Steril* 62:1277–1282
- Mortimer ST (2000) CASA – practical aspects. *J Androl* 21:515–524
- Abaigar T, Holt WV, Harrison RAP, del Barrio G (1999) Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol Reprod* 60:32–41. doi:10.1095/biolreprod60.1.32
- Holt W (1996) Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. *Reprod Domest Anim Physiol Pathol Biotechnol* 31:1–342
- Quintero-Moreno A (2003) Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Bellaterra Octubre 2003, doctoral thesis
- Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE (2004) Regression analysis and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology* 61:673–690. doi:10.1016/S0093-691X(03)00248-6
- Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE (2007) Multivariate cluster analysis regression procedures as tools to identify motile sperm subpopulation in rabbit semen and predict semen fertility and litter. *Reprod Domest Anim* 42:312–319. doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00785.x
- Rivera MM, Quintero-Moreno A, Barrera X, Palomo MJ, Rigau T, Rodríguez-Gil JE (2005) Natural Mediterranean photoperiod does not affect the main parameters of boar-semen quality analysis. *Theriogenology* 64:934–946
- Feldman EC, Nelson RW (1996) Clinical and diagnostic evaluation of the male reproductive tract. In: Canine and feline endocrinology and reproduction, 2nd edn. Saunders, Philadelphia, pp: 673–690
- Zaneveld LJD, Polakoski KL (1977) Collection and physical examination of the ejaculate. In: Hafez ESE (ed) Techniques of human andrology, chap 6. Elsevier/North-Holland Biomedical Press
- Kumi-Diaka J (1993) Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology* 39:1279–1289. doi:10.1016/0093-691X(93)90230-3
- England GC, Plummer JM (1993) Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* 47:261–270
- Rodríguez-Gil JE, Montserrat A, Rigau T (1994) Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology* 42:815–829. doi:10.1016/0093-691X(94)90450-W
- Kumi-Diaka J, Badtram G (1994) Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen. *Theriogenology* 41:1355–1366. doi:10.1016/0093-691X(94)90187-N
- Núñez-Martínez I, Moran JM, Peña FJ (2006) A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. *Reprod Domest Anim* 41:408–415. doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00685.x
- Amat A, Rigau J, Waynant RW, Ilev IK, Tomas J, Anders JJ (2005) Modification of the intrinsic fluorescence and the biochemical behavior of ATP after irradiation with visible and near-infrared laser light. *J Photochem Photobiol B* 81:26–32. doi:10.1016/j.jphotobiol.2005.05.012