



Universidad
Zaragoza

Efecto de las hormonas del tracto reproductor femenino sobre el citoesqueleto del espermatozoide

Trabajo Fin de Máster

Autora: Laura del Molino Álvarez

Director/es:

Dr. Rosaura Pérez Pé

Dr. Adriana Casao Gascón

Grupo Biología y Biotecnología de la Reproducción

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad
de Veterinaria

Noviembre 2016



La Dra. Rosaura Pérez Pé, Profesora Titular y la Dra. Adriana Casao Gascón, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza

INFORMAN:

Que la alumna Dña. Laura del Molino Álvarez, ha realizado bajo nuestra dirección, en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, su Trabajo Fin de Máster titulado "Estudio de la influencia de hormonas presentes en el tracto reproductor femenino sobre la reorganización del citoesqueleto en el espermatozoide". Este trabajo cumple los objetivos recogidos en las Directrices TFM, por lo que consideramos procedente su presentación.

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos la presente en Zaragoza a 25 de noviembre de 2016.



Rosaura Pérez Pé



Adriana Casao Gascón

Parte de los resultados derivados del presente Trabajo Fin de Máster fueron presentados como póster en el 10 th Biennial Conference de la AAAA (Asociation for Applied Animal Andrology) que se celebró en Tours (Francia) del 24 al 26 de Junio de 2016. Se incluye como anexo el poster presentado.

Título: **Effects of 17- β estradiol and progesterone on ram sperm functionality.**

Autores: **S. Gimeno**, L. Del Molino, A. Casao, J.A. Cebrián-Pérez, T. Muiño-Blanco and R. Pérez-Pé

Índice

1.	Resumen	3
1.	Abstract	4
2.	Introducción	5
2.1.	La capacitación espermática	5
2.1.1.	Capacitación espermática <i>in vitro</i>	7
2.2.	El citoesqueleto en el espermatozoide	8
2.3.	Efecto de las hormonas esteroideas sobre el espermatozoide	10
2.3.1.	Acciones de la progesterona sobre el espermatozoide	12
2.3.1.1.	<i>La progesterona y la capacitación espermática</i>	12
2.3.1.2.	<i>La progesterona y la motilidad espermática</i>	13
2.3.1.3.	<i>La progesterona y la reacción acrosómica</i>	14
2.3.2.	Acciones del estradiol sobre el espermatozoide	14
2.3.2.2.	<i>El estradiol y la capacitación espermática</i>	15
2.3.2.3.	<i>El estradiol y la motilidad espermática</i>	15
2.2.3.3.	<i>El estradiol y la reacción acrosómica</i>	15
3.	Hipótesis y objetivos	17
4.	Material y métodos	18
4.1.	Obtención de la muestra	18
4.2.	Separación espermática mediante el método <i>swim-up</i> /dextrano	18
4.3.	Capacitación espermática <i>in vitro</i>	20
4.4.	Evaluación de las muestras espermáticas	21
4.5.	Evaluación de la capacitación espermática	23
4.6.	Determinación de la distribución de actina por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	25
4.7.	Determinación de la polimerización de actina por unión a Faloidina	26
4.8.	Detección de la fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas de membrana espermáticas por Western blotting	28
4.9.	Análisis estadísticos	29
5.	Resultados y discusión	30
5.1.	Efecto de la progesterona y el estradiol sobre la motilidad espermática.	30
5.2.	Efecto de las hormonas en la distribución intracelular de calcio	32
5.3.	Evaluación de la fosforilación de residuos de tirosina mediante western blotting	35

5.4.	Determinación de la distribución de actina por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI):.....	37
5.5.	Determinación de la polimerización de actina por unión a faloidina.	41
6.	Conclusiones	44
6.	Conclusions	45
7.	Bibliografía.....	46

1. Resumen

La progesterona y el estradiol son hormonas esteroideas que ejercen su acción en el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal a través de receptores nucleares. Sin embargo en los últimos años se ha postulado la existencia de otro tipo de receptores que iniciarían una ruta de señalización no genómica en determinadas células diana.

La presencia de ambas hormonas en el tracto reproductor femenino, así como la demostración de la existencia de sus respectivos receptores en el espermatozoide, sugieren que tanto la progesterona como el estradiol podrían jugar un papel importante en la regulación de la funcionalidad espermática a lo largo del tracto genital de la hembra, interviniendo en procesos tan importantes como la capacitación, la hiperactivación de la motilidad y la reacción acrosómica. La capacitación es el conjunto de cambios que sufre el espermatozoide en el tracto reproductor femenino, que le preparan para sufrir la reacción acrosómica, y que le confieren capacidad fecundante. Todos estos procesos estarían relacionados con cambios en la organización del citoesqueleto.

Dado que no existe consenso sobre el efecto que estas hormonas podrían ejercer sobre el espermatozoide, el presente trabajo pretende estudiar los cambios relacionados con la capacitación y la organización del citoesqueleto que se producen en espermatozoides de la especie ovina al incubarlos en condiciones capacitantes con dos concentraciones distintas de cada hormona (1 μ M y 100 pM).

Los resultados del presente trabajo mostraron un aumento significativo en el porcentaje de espermatozoides con una distribución intracelular de calcio asociada al proceso de capacitación en las muestras incubadas con ambas hormonas. Sin embargo, no se observó un aumento en la fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas de membrana ni en la motilidad progresiva de los espermatozoides. Así mismo, también se observaron cambios estadísticamente significativos en la distribución del citoesqueleto de actina.

1. Abstract

The action of progesterone and estradiol through the hypothalamic-pituitary-gonadal axis is mediated by nuclear receptors. However, in the recent years, the existence of another type of receptors has been proposed. These receptors could stimulate non-genomic signaling pathways in target cells.

The presence of both hormones in the female genital tract combined with the existence of their receptors in the spermatozoa, suggests that both progesterone and estradiol could play an important role on the sperm functionality within the female reproductive tract by the regulation of important events as capacitation, hyperactivated motility and acrosome reaction.

The biochemical changes spermatozoa must undergo in the female reproductive tract in order to have the ability to develop the acrosome reaction and penetrate and fertilize an egg is called capacitation. All of these changes are related to a reorganization of the actin cytoskeleton of the cell.

Due to the lack of agreement on the effect of these two hormones on the spermatozoa, one of the aims of this study was to analyze the changes, according to capacitation and cytoskeleton reorganization, experimented by ram sperm incubated with two different concentration of each hormone (1 μ M and 100pM).

Our results shown that the presence of progesterone and estradiol in the incubation medium increased significantly the percentage of spermatozoa with an intracellular distribution of calcium related to the capacitation state in comparison to the control group. However there were no significant differences in the percentage of motile spermatozoa or membrane protein tyrosine phosphorylation.

Likewise, the incubation with these hormones also showed significant changes in the actin cytoskeleton distribution.

2. Introducción

2.1. La capacitación espermática

En mamíferos, los espermatozoides presentes en el eyaculado no son capaces por sí mismos de fecundar al ovocito. Para que esto pueda ocurrir, deben darse una serie de cambios que permitan al espermatozoide adquirir las características necesarias para unirse al ovocito y dar lugar a un cigoto. Estos cambios se producen secuencialmente durante un complejo proceso conocido como capacitación y ocurren de forma natural en el tracto reproductor femenino (Yanagimachi, 1994).

Entre otros eventos fisiológicos y bioquímicos, el proceso de capacitación cursa con un aumento de la fluidez de la membrana plasmática (Gadella *et al.*, 2008), cambios en la distribución del calcio intracelular (Lishko *et al.*, 2011) y la activación de diferentes rutas de señalización celular (Grasa *et al.*, 2006).

Además, al final de la capacitación también se produce un cambio en la motilidad del espermatozoide conocido como hiperactivación flagelar. De esta forma el espermatozoide de mamífero presenta dos tipos de motilidad fisiológica (Katz *et al.*, 1981):

- Una motilidad activada, caracterizada por una trayectoria relativamente recta, propia del espermatozoide recién eyaculado.
- Una motilidad hiperactivada, característica de espermatozoides con capacidad fecundante y consistente en curvas mucho más profundas, produciendo un movimiento casi circular o en forma de ocho (Yanagimachi, 1994).

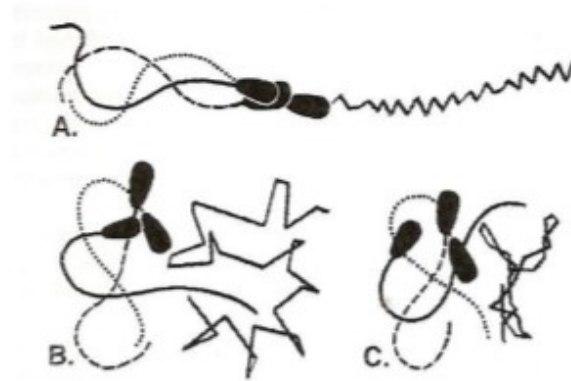


Figura 2.1.: Patrón de movimiento espermático. Motilidad activada (A) e hiperactivada (B y C). En la motilidad hiperactivada se observan cambios en la trayectoria que pasa de ser recta a errática (Ho and Suarez, 2001).

Durante el proceso de capacitación el espermatozoide pasa de una motilidad activada a una hiperactivada (Figura 2.1.), reduciendo el batido flagelar en torno a un sexto. Este cambio en el patrón de movimiento se produce durante el tránsito por el tracto reproductor femenino, por lo que podría estar estimulado por los componentes de las secreciones del mismo (Zaneveld *et al.*, 1991).

Todos estos eventos que ocurren durante el proceso de capacitación permiten al espermatozoide experimentar la reacción acrosómica (RA). La RA es un proceso de exocitosis controlada en el que se liberan enzimas hidrolíticas situadas en la parte apical de la cabeza del espermatozoide y le permiten penetrar en la zona pelúcida del ovocito posibilitando la fecundación. Sólo los espermatozoides capacitados pueden llevar a cabo la reacción acrosómica (Figura 2.2.).

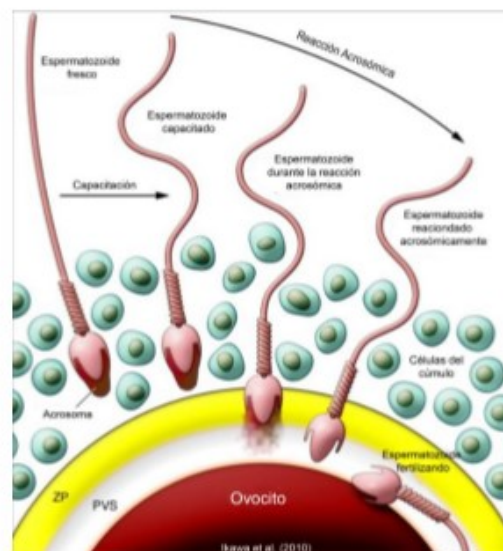


Figura 2.2.: Esquema de la reacción acrosómica (RA). La liberación de enzimas hidrolíticas presentes en la zona acrosomal de la cabeza del espermatozoide permite a este atravesar la zona pelúcida del ovocito (Ikawa *et al.*, 2010).

Un hecho fundamental para que se produzca esta reacción acrosómica, es la reorganización del citoesqueleto, que también va asociada con el proceso de capacitación (Muratori *et al.*, 2009), aunque los mecanismos moleculares implicados en este reordenamiento interno no se conocen del todo bien.

2.1.1. Capacitación espermática *in vitro*

Los procesos de mejora y desarrollo de las especies ganaderas están ligados mayoritariamente a la inseminación artificial, aunque en animales especialmente valiosos también se utilizan otras técnicas de reproducción asistida como la fecundación *in vitro*. Dado que la capacitación espermática ocurre de manera natural en el tracto reproductor femenino, la utilización de estas últimas técnicas de reproducción asistida están inevitablemente ligadas a procesos de capacitación *in vitro*, que permitan a los espermatozoides alcanzar el grado de madurez necesario para fecundar el ovocito.

La capacitación *in vitro* consta de dos pasos fundamentales:

- 1) Eliminación del plasma seminal ya que este ejerce un efecto negativo sobre la capacitación espermática (Mortimer, 1994). Existen distintas técnicas de lavado espermático que permiten recuperar espermatozoides libres de plasma seminal (Mortimer and Mortimer, 1992), como el lavado por gradientes de densidad o la técnica de *swim-up*, basada en la capacidad de los espermatozoides de nadar desde el fondo de un tubo hasta la superficie, dejando abajo el resto de componentes del eyaculado.
- 2) Incubación de los espermatozoides libres del plasma seminal en diluyentes específicos y condiciones que se asemejen a las del tracto reproductor femenino (Visconti *et al.*, 2002). Estos diluyentes suelen contener sustratos energéticos (piruvato, lactato, glucosa), albúmina como aceptor de colesterol, bicarbonato y calcio, además de otros compuestos.

El mecanismo por el cual estos componentes promueven la capacitación sigue siendo motivo de estudio. Parte del proceso ha podido ser identificado, ya que se ha determinado una correlación entre la capacitación y

la salida de colesterol de la membrana plasmática (Jin and Yang, 2016), lo que conlleva un incremento en la fluidez de la misma, con una modificación en la concentración de iones y una hiperpolarización de la membrana. Todo ello es necesario para que se produzca la hiperactivación espermática y finalmente la reacción acrosómica.

2.2. El citoesqueleto en el espermatozoide

El citoesqueleto es una estructura tridimensional que, entre otras cosas, proporciona un soporte interno a las células, organiza sus estructuras internas e interviene en procesos como la división celular. Está compuesto por una red de filamentos proteicos que actúan de forma dinámica y determinan la forma y la organización de los orgánulos celulares dentro de la propia célula.

La actina se encuentra presente en las células como monómeros libres en forma globular (G-actina) o como polímeros lineales en forma de filamentos (F-actina). En el espermatozoide, la estructura y localización de los filamentos de actina no está clara. En el espermatozoide humano (Figura 2.3.), el más estudiado, las regiones con mayor presencia de actina serían el espacio acrosomal, el segmento ecuatorial, la zona postacrosomal, así como el flagelo (Fouquet and Kann 1992).

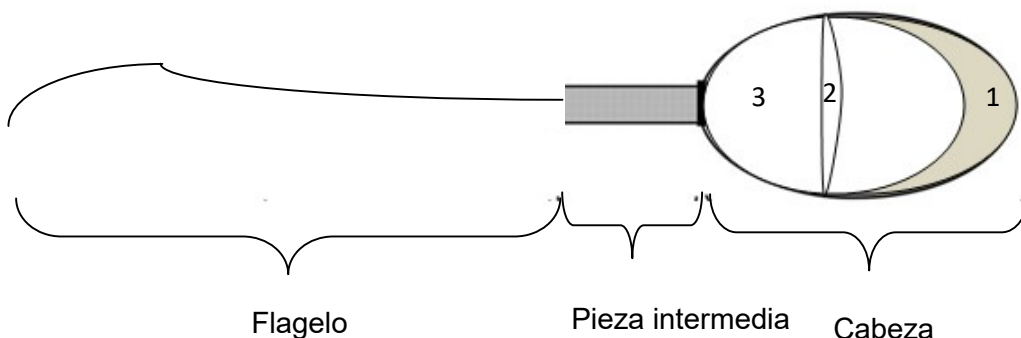


Figura 2.3.: Esquema de un espermatozoide. En la cabeza se aprecia la zona acrosomal (1), el segmento ecuatorial (2) y la zona post-acrosomal (3)

En el flagelo, la actina podría jugar un papel importante en la regulación del movimiento flagelar (Lin *et al.*, 2002), mientras que en la cabeza, su

localización en la región acrosomal de numerosas especies podría indicar su implicación en procesos tan importantes como la capacitación o la reacción acrosómica (Romarowski *et al.*, 2016).

En espermatozoides de distintas especies se ha descrito que la capacitación *in vitro* viene acompañada de un aumento en la polimerización de la actina mientras que para que se lleve a cabo la reacción acrosómica es necesario que se produzca una rápida despolimerización de los filamentos (Brener *et al.*, 2003).

Este estudio demostró que el bloqueo de la polimerización de la actina por faloidina inhibía la capacitación espermática así como la reacción acrosómica. Además también se demostró que esta polimerización y despolimerización de actina estaba fuertemente influenciada por la concentración de calcio intracelular.

Por otro lado, Saponaro y cols.(2012).también observaron un descenso en el porcentaje de espermatozoides capacitados en presencia de un inhibidor de la polimerización de actina. Este trabajo también reveló que la actina polimerizada podría interactuar con diferentes compartimentos subcelulares, actuando como un coordinador de rutas celulares implicadas en la funcionalidad espermática

Ambos trabajos confirmaron que la remodelación de la estructura de actina en la cabeza del espermatozoide juega un papel importante en los procesos de capacitación y reacción acrosómica.

Otro componente importante del citoesqueleto espermático es la tubulina. La tubulina es una proteína que compone los microtúbulos del flagelo y que por tanto está también implicada en la motilidad espermática (Mendes Maia *et al.*, 2015). La alta presencia de esta proteína en el flagelo sugiere que podría estar relacionada con la hiperactivación de la motilidad espermática asociada a la capacitación; sin embargo, las modificaciones que sufre la tubulina para alcanzar este tipo de movimiento no se conocen demasiado bien (Palecek *et al.*, 1999).

2.3. Efecto de las hormonas esteroideas sobre el espermatozoide

En general, la acción de la progesterona y el estradiol en la regulación de la expresión génica en el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, que controla la reproducción en mamíferos, está mediada por receptores nucleares. Sin embargo, existen estudios *in vitro* que también sugieren que ambas hormonas esteroideas podrían ejercer una acción no genómica por unión a receptores en la membrana plasmática de sus células diana (Razandi *et al.*, 1999). De esta manera, su efecto sería mucho más rápido que el genómico, siendo detectable en cuestión de minutos frente a las horas o días que tardaría en hacer efecto por la vía nuclear. (Figura 2.4.)

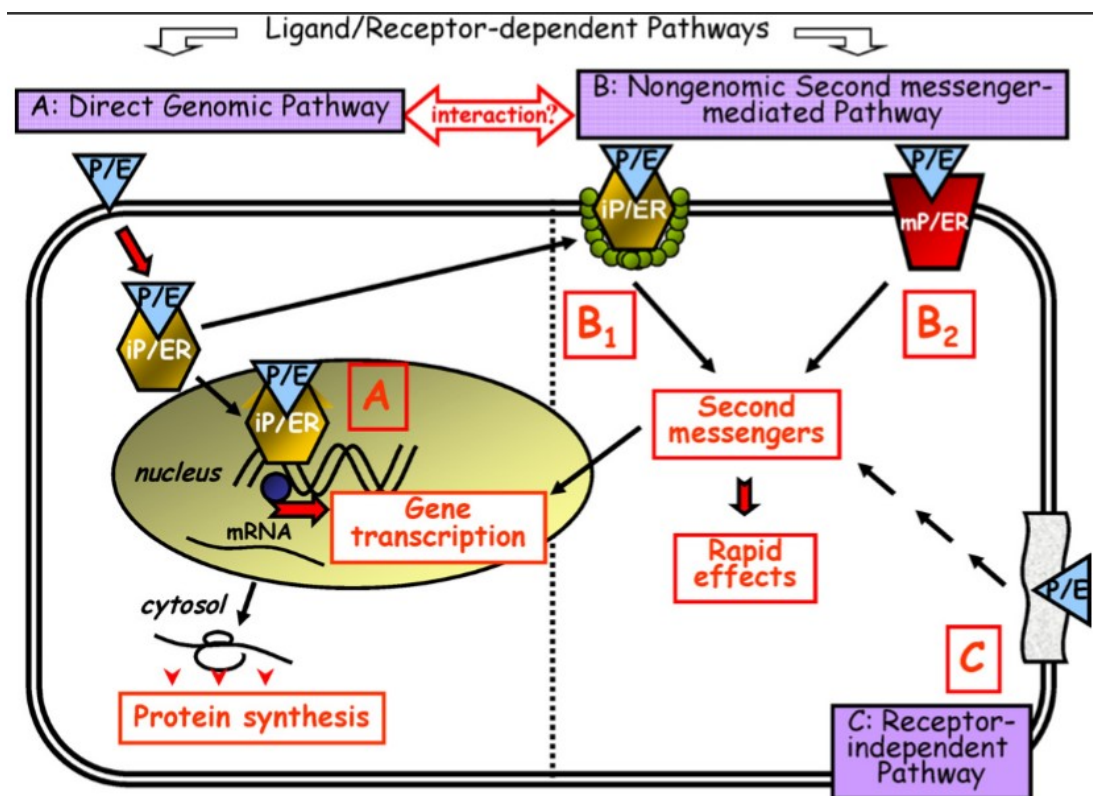


Figura 2.4.: Efecto genómico (izquierda) y no genómico (derecha) de la progesterona y el estradiol sobre una célula somática (Baldi *et al.*, 2009)

La primera demostración de la existencia de un efecto directo de las hormonas esteroideas sobre el espermatozoide se produjo en 1998 cuando Calzada y cols. (1988) observaron un incremento en el potencial de membrana en espermatozoide humano tras el tratamiento con testosterona, estrógenos y

progesterona. Un año más tarde Osman y cols.(1989) demostraron la rápida inducción de la reacción acrosómica por la progesterona en espermatozoide humano.

La progesterona y el estradiol están presentes en el tracto reproductor femenino en concentraciones del orden de nanomolar (Carson and Challis, 1981).La progesterona es sintetizada en los ovarios, glándulas adrenales y placenta. Además las células del *cúmulus* que rodean al ovocito secretan progesterona a concentraciones del orden de micromolar (Teves *et al.*, 2006). El estradiol se sintetiza en distintos lugares del organismo como la corteza suprarrenal o el tejido adiposo, pero destaca sobre todo su producción en las células de la granulosa ovárica en las hembras y en las células de Leydig testiculares en los machos.

La concentración de estas hormonas en los fluidos del tracto reproductor femenino es difícil de calcular, ya que depende tanto de el momento del ciclo estral en que se encuentre la hembra, como la especie animal o el número de células del *cúmulus* que rodean al ovocito, pero se estima que existe un gradiente de concentración desde las proximidades del ovocito hasta las regiones más distales (Sagare-Patil *et al.*, 2012).

La forma en la que estas hormonas esteroideas ejercen estas rápidas acciones no-genómicas sobre los espermatozoides es todavía materia de discusión. Podría ser a través de los mismos receptores nucleares clásicos localizados en caveolas en la membrana plasmática o bien mediante su unión a receptores de membrana específicos, que podrían ser totalmente diferentes a los clásicos (Baldi *et al.*, 2009).

Diferentes trabajos a lo largo de las últimas décadas han mostrado evidencias de un tipo u otro de receptores de progesterona en espermatozoides de distintas especies (Cheng *et al.*, 1998; Sirivaidyapong *et al.*, 2001; De Amicis *et al.*, 2011; Rago *et al.*, 2014) por lo que parece factible la existencia de ambos.

En cuanto a los receptores de estrógenos que median esta acción no genómica, se han postulado tanto los clásicos, ER α , ER β como otros diferentes, como el GPR30 (Ded *et al.*, 2013).

En la especie ovina, nuestro grupo ha evidenciado recientemente la presencia tanto de receptores de progesterona (González-Arto, 2013) como la del receptor de estrógeno β (Er β) (Casao *et al.*, 2011) en el espermatozoide.

En las últimas décadas han surgido numerosos trabajos sobre la implicación de la progesterona y el estradiol en procesos tan importantes como la capacitación, el cambio en el patrón de movimiento y la reacción acrosómica en espermatozoides de varias especies (Muratori *et al.*, 2009) si bien hasta la fecha no existen publicaciones sobre sus efectos en el espermatozoide ovino. A continuación se describirán de forma más detallada las acciones descritas para cada una de las hormonas en otras especies.

2.3.1. Acciones de la progesterona sobre el espermatozoide

Existen numerosos estudios sobre el efecto de la progesterona en la capacitación in vitro de espermatozoides (Yamano *et al.*, 2004; Fujinoki, 2010; Gautier *et al.*, 2016) pero muy pocos en la especie ovina.

Aunque el mecanismo de acción exacto no está claro, diferentes trabajos sugieren que la progesterona podría activar rutas de señalización intracelular implicadas en los procesos relacionados con la capacitación, la hiperactivación de la motilidad o la reacción acrosómica. Entre estas rutas se encontrarían la generación de AMP cíclico (AMPC), la fosforilación de residuos de tirosina, la activación de fosfolipasas y el incremento de calcio intracelular (Baldi *et al.*, 2009).

2.3.1.1. *La progesterona y la capacitación espermática*

Como se ha explicado anteriormente, la capacitación es un proceso complejo que ocurre de forma natural en el tracto reproductor femenino y a

través del cual el espermatozoide adquiere una serie de características que le permitirán, en última instancia, fecundar al ovocito.

Para conseguir la capacitación de espermatozoides *in vitro* son necesarios diluyentes específicos que incluyan sustancias capaces de inducir los cambios necesarios para que se lleve a cabo tanto este proceso como la posterior reacción acrosómica.

Hay estudios en la especie humana que sugieren que la adición de progesterona a estos diluyentes durante el proceso de capacitación *in vitro* tendría un efecto positivo sobre este proceso (Yamano *et al.*, 2004), sin embargo, ni en la especie equina ni en la bovina, este efecto inductor de la progesterona sobre la capacitación no ha podido ser demostrado (Therien and Manjunath, 2003; Neild *et al.*, 2005).

Por otra parte, la falta de consenso para fijar un marcador universal que confirme que se ha producido la capacitación *in vitro* hace que sea muy difícil definir de forma clara el efecto de la progesterona sobre este proceso.

2.3.1.2. *La progesterona y la motilidad espermática*

Las células del *cúmulus* que rodean al ovocito secretan progesterona a una concentración del orden de micromolar (Teves *et al.*, 2006). Dado que la motilidad del espermatozoide pasa a un estado hiperactivado en las proximidades del ovocito, se podría postular que la progesterona jugaría un papel importante en este cambio en el movimiento espermático.

Muchos factores afectan a la motilidad espermática incluyendo el calcio, el AMPc y otros componentes de los fluidos del tracto reproductor femenino (Luconi *et al.*, 2006). Además, tanto en la especie humana (Sagare-Patil *et al.*, 2012) como en ratón (Roldan *et al.*, 1994; Harper *et al.*, 2004), diferentes estudios *in vitro* han demostrado que la progesterona es capaz de inducir el patrón de movimiento asociado a la capacitación (hiperactivación) a concentraciones entre 3 y 5 μM . Sin embargo, en otras especies como la equina (Neild *et al.*, 2005) y la bovina (Therien and Manjunath, 2003), esta hormona parece carecer de este efecto inductor de la hiperactivación.

También se ha demostrado que la progesterona induce la modificación de los niveles de calcio intracelular en las proximidades del flagelo, lo que sugeriría que este mecanismo podría ser el responsable de la inducción de la hiperactivación (Harper *et al.*, 2004).

2.3.1.3. *La progesterona y la reacción acrosómica*

La interacción entre la zona pelúcida del ovocito y la cabeza del espermatozoide tiene como resultado la fusión de la membrana plasmática con la acrosomal externa, permitiendo la liberación de las enzimas proteolíticas presentes en el acrosoma, es decir, la reacción acrosómica. Uno de los numerosos factores implicados en esta reacción podría ser la progesterona, presente en el tracto reproductor de la hembra (Muratori *et al.*, 2009). La progesterona está fuertemente relacionada con la entrada de calcio al interior celular (Bedu-Addo *et al.*, 2007) y este ión es uno de los más importantes a la hora de llevar a cabo dicha reacción acrosómica.

2.3.2. Acciones del estradiol sobre el espermatozoide

Durante muchos años se creía que los estrógenos eran hormonas principalmente femeninas que contribuían a la salud y fertilidad de la hembra. Sin embargo en las últimas décadas, se ha postulado la importancia que podrían tener también en el macho, afectando a la capacidad reproductiva del mismo (Filippi *et al.*, 2002).

La importancia de los estrógenos en la producción espermática quedó demostrada con la creación de ratones *knock-out* para el receptor de estrógeno α (ER α) que presentaban, entre otros problemas, alteraciones en la espermatogénesis e infertilidad (Eddy *et al.*, 1996).

Pero además, como los estrógenos se hayan presentes en el tracto reproductor femenino, una vez que los espermatozoides se encuentran en ese ambiente, su funcionalidad podría verse afectada por las acciones no genómicas de estas hormonas, mediadas por su unión a receptores transmembrana.

2.3.2.2. *El estradiol y la capacitación espermática*

El estrógeno más potente es el 17β -estradiol (E_2) y su efecto sobre la capacitación espermática ha sido ampliamente estudiado, si bien es todavía motivo de discusión. Mientras unos autores han demostrado un efecto positivo sobre la capacitación (Ded *et al.*, 2013; Gautier *et al.*, 2016; Gray *et al.*, 2016), otros han concluido que la presencia de estradiol disminuye la probabilidad del espermatozoide de sufrir la capacitación y la reacción acrosómica, independientemente de la presencia de progesterona, tanto en ratón (Sebkova *et al.*, 2012), como en la especie humana (Vigil *et al.*, 2008).

2.3.2.3. *El estradiol y la motilidad espermática*

Al igual que ocurre con la progesterona, la mayor concentración de estradiol en las proximidades del ovocito podría sugerir que juega un papel importante en la consecución del movimiento hiperactivado; sin embargo, la acción de esta hormona sobre la motilidad espermática tampoco está clara.

Mientras unos autores no observan cambios significativos en el patrón de movimiento (Adeoya-Osiguwa *et al.*, 2003), otros afirman que el estradiol podría inhibir la hiperactivación estimulada por otras hormonas como la progesterona o la melatonina, pero sin tener ningún efecto por sí mismo sobre el movimiento del espermatozoide (Fujinoki and Takei, 2015).

2.2.3.3. *El estradiol y la reacción acrosómica*

El posible efecto del estradiol sobre la reacción acrosómica también ha sido objeto de desacuerdo. Mientras unos autores proponen que los estrógenos presentes en el ambiente del tracto reproductor de la hembra podrían favorecer la reacción acrosómica (Adeoya-Osiguwa *et al.*, 2003), otros sugieren que el efecto favorable de la progesterona sobre reacción acrosómica podría estar inhibido por altas dosis de 17β -estradiol (Ded *et al.*, 2013).

En definitiva, existe mucha controversia en cuanto al efecto de las hormonas esteroideas, progesterona y estradiol, sobre el espermatozoide, y su mayor o menor implicación en procesos tan importantes como la capacitación, la hiperactivación o la reacción acrosómica.

Por tanto, conocer mejor cómo afectan estas hormonas a la funcionalidad espermática mediante una vía no genómica permitiría utilizar diluyentes específicos formulados con la presencia de agonistas o antagonistas de sus receptores, mejorando así las condiciones de almacenamiento o refrigeración de las muestras seminales.

La acción de la progesterona sobre la remodelación del citoesqueleto ya ha sido descrita en distintas células somáticas (Wessel *et al.*, 2014; Pina-Medina *et al.*, 2016).

Dado que esta hormona se encuentra en el tracto reproductor femenino y existen receptores de la misma en la cabeza del espermatozoide, podría también jugar un papel importante en la reorganización del citoesqueleto del espermatozoide, implicada a su vez en los procesos de capacitación y reacción acrosómica.

Del mismo modo, el estradiol podría ejercer un efecto regulador en la remodelación del citoesqueleto de actina aunque no existen estudios que prueben su acción.

3. Hipótesis y objetivos

Tanto la progesterona como el estradiol son hormonas esteroideas presentes en el tracto reproductor de la hembra que podrían estar relacionadas con la funcionalidad y supervivencia espermática.

Los efectos concretos que juegan estas hormonas sobre los espermatozoides, así como las rutas de señalización implicadas en los mismos, no están del todo claros y son objeto de debate entre distintos autores.

Un conocimiento más profundo de las acciones de estas hormonas sobre la funcionalidad espermática podría ser útil a la hora de desarrollar diluyentes o medios específicos para las tecnologías de reproducción asistida, tanto en la especie humana, como en otras especies animales.

Por todo esto, en el presente trabajo se plantea la hipótesis de que la incubación de espermatozoides ovinos en medios que incluyan progesterona o estradiol en condiciones capacitantes, podría dar lugar a cambios tanto en el porcentaje de espermatozoides capacitados, como en la reorganización del citoesqueleto espermático.

Los objetivos planteados son los siguientes:

- Estudiar el efecto de la progesterona y el estradiol en la reorganización del citoesqueleto del espermatozoide ovino.
- Evaluar la acción de estas hormonas en la capacitación espermática ovina.

4. Material y métodos

4.1. Obtención de la muestra

Las muestras seminales se obtuvieron de nueve moruecos adultos (entre 3 y 6 años) de la raza *Rasa Aragonesa* pertenecientes a la Asociación Nacional de Ganaderos (ANGRA) y mantenidos en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Zaragoza. La extracción corrió a cargo del personal del SEA obteniéndose dos eyaculados consecutivos de cada semental mediante el método de vagina artificial, en un régimen de tres extracciones semanales.

De acuerdo con estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación que demostraban una mayor calidad del segundo eyaculado con respecto al primero (Ollero *et al.*, 1996), fueron estos segundos eyaculados los que se utilizaron en el presente trabajo. Se trabajó con la mezcla de segundos eyaculados de varios sementales para evitar diferencias individuales y se mantuvieron las muestras a una temperatura de 37°C hasta su utilización.

4.2. Separación espermática mediante el método *swim-up*/dextrano

El contacto prolongado de los espermatozoides con el plasma seminal presente en el eyaculado resulta perjudicial para los mismos, afectando a su capacitación (Mortimer, 1994). Para impedir que este hecho influyera en los resultados de nuestros experimentos fue necesario separar las células espermáticas de este plasma seminal.

Para ello se empleó una variante del método de *swim-up* basado en el descrito por Álvarez para espermatozoides humanos (1993), pero con modificaciones, tanto en los diferentes pasos del proceso como en la composición del medio, para su aplicación a semen ovino. Este método, puesto a punto en nuestro laboratorio por García-López y cols.(1996) se conoce como *swim-up*/dextrano y no incluye etapas de centrifugación que perjudicarían la

calidad de los espermatozoides ovinos. Se basa en la capacidad de los espermatozoides de “nadar” desde el eyaculado, situado en el fondo del tubo, hasta una capa de recogida situada por encima, atravesando una capa intermedia rica en dextrano. Esta capa actúa como barrera, dificultando el paso de espermatozoides con mala motilidad o con membrana alterada. En la capa superior de recogida se obtiene así una muestra enriquecida en espermatozoides con buena motilidad e integridad de membrana (Figura 4.1)

El medio utilizado para la realización de la técnica fue el MS, compuesto por NaCl 50 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 0,4 mM, K₂HPO₄ 0,3 mM, glucosa 2,8mM, HEPES 21 mM, piruvato sódico 0,3 mM, lactato sódico 18,6 mM y sacarosa 200 mM. También se añadió penicilina (1,5 UI/ml) y estreptomycin (15 µg/ml) para evitar la contaminación bacteriana. El pH del medio se ajustó a 6,5. Este medio no contenía ni CaCl₂ ni NaHCO₃ para evitar una capacitación prematura de las células (Grasa *et al.*, 2004).

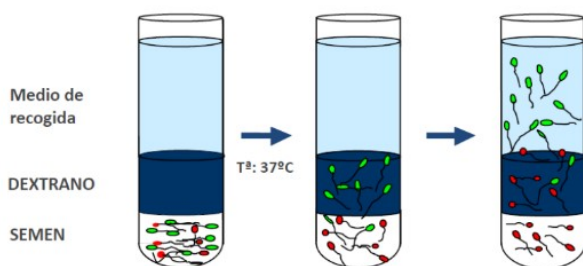


Figura4.1.: Esquema del método *swim-up/dextrano*: Los espermatozoides con mala motilidad o con la membrana dañada no son capaces de atravesar la capa de dextrano y quedan en el fondo del tubo. Los espermatozoides con la membrana intacta y buena motilidad suben a la superficie donde se recogen.

Para la realización del *swim-up/dextrano* se depositaron cuidadosamente 500 µl de la muestra de semen en el fondo de un tubo redondeado de 15 mm de diámetro. Sobre éste, se añadieron 500 µl de medio MS que incluía dextrano a una concentración de 30mg/ml. Sobre esta capa se añadió lentamente y dejando resbalar por las paredes del tubo 1,5 ml de medio de recogida MS-A(MS + 5mg/ml de Albúmina Sérica Bovina (BSA)).

Tras 15 minutos se recogieron 750 µl de sobrenadante y se añadieron otros 750µl de medio MS-A, deslizándolo por la pared del tubo. Este proceso se

repitió otras 3 veces. Se desechó la primera recogida por contener todavía trazas de plasma seminal y se trabajó con la mezcla de las otras 3.

4.3. Capacitación espermática *in vitro*

Las alícuotas de capacitación se prepararon a una concentración espermática de $1,6 \times 10^8$ cel/ml en medio TALP (Younis *et al.*, 1991) a partir de las muestras seleccionadas por *swim-up*/dextrano. Este medio, uno de los más comúnmente utilizados para llevar a cabo la capacitación *in vitro* en la mayoría de las especies, está compuesto por NaCl 100 mM, KCl 3,1 mM, NaHCO₃ 25 mM, NaH₂PO₄ 0,3 mM, lactato sódico 21,6 mM, CaCl₂ 3 mM, MgCl₂ 0,4 mM, HEPES 10 mM, piruvato sódico 1 mM y glucosa 5 mM; se añadieron 5 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA), y se ajustó su pH a 7,2. Las muestras se incubaron en una estufa a 39°C, con 5% de CO₂ y 100% de humedad, durante tres horas.

Para evaluar la acción de la progesterona y el estradiol en la capacitación espermática se ensayaron dos concentraciones distintas de cada hormona (1µM y 100pM) que se añadieron al medio TALP. Las concentraciones de hormona ensayadas se decidieron en base a las estimaciones de la concentración fisiológica de progesterona en el tracto reproductor femenino (Wang *et al.*, 2001), así como las usadas en trabajos de otros autores que estudian el efecto de dichas hormonas en el espermatozoide (Teves *et al.*, 2006; Guidobaldi *et al.*, 2008; Lishko *et al.*, 2011).

De esta forma, en cada experimento se mantuvieron en incubación en condiciones capacitantes un total de 5 muestras, una por cada concentración de cada hormona y otra como control que contenía exclusivamente el medio TALP.

Las muestras se denominaron de la siguiente forma:

- **Control 0h (SUP):** muestra obtenida por *swim-up*. Sin incubación.
- **Control 3h(C3h):** muestra obtenida por *swim-up* e incubada 3 horas en medio TALP.
- **1µME₂:** muestra obtenida por *swim-up* e incubada 3 horas en medio TALP + **Estradiol 1 µM.**

- **100pME₂**: muestra obtenida por *swim-up* e incubada 3 horas en medio TALP + **Estradiol 100 pM**.
- **1µMP₄**: muestra obtenida por *swim-up* e incubada 3 horas en medio TALP + **Progesterona 1 µM**.
- **100pMP₄**: muestra obtenida por *swim-up* e incubada 3 horas en medio TALP + **Progesterona 100pM**.

4.4. Evaluación de las muestras espermáticas

4.4.1. Concentración espermática

La concentración espermática, definida como el número de espermatozoides por mililitro presentes en una muestra, se determinó tras su recuperación por *swim-up*. Para ello se realizó una dilución 1:100 con agua y se procedió al conteo de células en una cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania). Se determinó el número de células presentes en un volumen de 0,1 mm³ y se aplicó la fórmula siguiente:

$$C = n^{\circ} \text{espermatozoides} \times 10^4 \times \frac{1}{\text{dilución}} = \text{cel/ml}$$

4.4.2. Motilidad espermática

El porcentaje de espermatozoides móviles así como el de motiles progresivos (entendiendo estos segundos como los que describen una trayectoria rectilínea) se evaluó utilizando un sistema computarizado de análisis espermático (CASA, *computer assisted sperm analysis*), concretamente el ISAS (Integrated Semen Analysis System) 1.0.4 (Proiser SL, Valencia, España). Para ello se colocó una gota de 6 µl de cada muestra sin diluir (excepto la muestra SUP que se diluyó 1:10 en medio bifase (sacarosa 0,25 M, glucosa 5mM, EGTA 0,1 mM, NaH₂PO₄ (pH 7,5) 7 mM, KOH 2 mM y HEPES 10 mM) entre un porta y un cubre previamente atemperados y se observó con objetivo 10x en un microscopio de contraste de fases a través de un monitor de ordenador equipado con el sistema CASA (Figura 4.2.A).

Se analizaron cinco campos distintos por cada gota y el programa identificó y clasificó las trayectorias de los espermatozoides en lentas, medias y rápidas (Figura 4.2. B). Así mismo proporcionó un porcentaje de espermatozoides móviles y móviles progresivos en función de los totales.

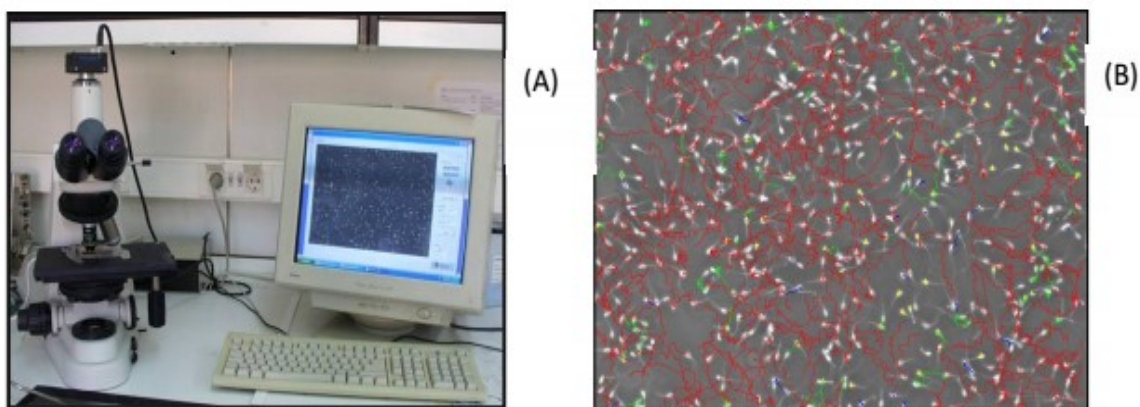


Figura 4.2.: (A) Equipo de análisis de la motilidad espermática . (B) Análisis de la imagen microscópica (objetivo de 10x) analizada por el programa ISAS (Integrated Semen AnalysisSystem). Aparecen marcados los espermatozoides estáticos (en amarillo), y la trayectoria de los espermatozoides móviles lentos (azul), medios (verde) y rápidos (rojo).

Además el sistema CASA proporcionó valores medios de parámetros cinéticos que aparecen recogidos en la tabla 1:

Tabla 1: Parámetros cinéticos analizados por el sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) utilizado para analizar la motilidad espermática

PARÁMETRO	UNIDAD	DEFINICIÓN
Velocidad curvilínea (VCL)	$\mu\text{m/s}$	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo.
Velocidad rectilínea (VSL)	$\mu\text{m/s}$	Distancia recorrida por el espermatozoide desde el primer punto hasta el último de su trayectoria.
Velocidad media (VAP)	$\mu\text{m/s}$	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media en función del

		tiempo.
Índice de linearidad (LIN)	%	Relación porcentual entre la VSL y la VCL
Índice de rectitud (STR)	%	Relación porcentual entre la VSL y la VAP
Índice de oscilación (WOB)	%	Relación porcentual entre la VAP y la VCL
Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH)	$\mu\text{m/s}$	Desplazamiento medio efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.
Frecuencia de batida de cola (BCF)	Hz	Frecuencia con la cual la trayectoria curvilínea atraviesa la lineal o media en función del tiempo
Móviles no Progresivos (MNP)	%	Porcentaje de espermatozoides que se mueven sin desplazamiento apreciable
Móviles progresivos (MP)	%	Porcentaje de espermatozoides que presentan desplazamiento.
Estáticos	%	Porcentaje de espermatozoides que no presentan motilidad.

4.5. Evaluación de la capacitación espermática

Para estudiar el estado de capacitación de las muestras espermáticas se utilizó la tinción con clorotetraciclina (CTC). La clorotetraciclina es un antibiótico que penetra en el interior celular y se une al calcio (Caswell and Hutchison, 1971), dando una coloración fluorescente (Ericsson, 1967), lo que origina distintos patrones de fluorescencia en función de la distribución de este ion intracelularmente. Los espermatozoides capacitados, no capacitados y reaccionados (entendidos estos últimos como los que ya han realizado la reacción acrosómica), presentan patrones específicos de tal forma que pueden

distinguirse unos de otros (Ward and Storey, 1984). Esta técnica fue validada por nuestro grupo de investigación en la especie ovina (Grasa *et al.*, 2006).

Para la realización de la técnica se mezclaron 20 μ l de cada una de las muestras analizadas (la SUP diluida 1:10 en medio bifase, las restantes sin diluir) con 20 μ l de solución CTC, que contiene 2 mg de CTC disueltos en 5 ml de un tampón compuesto por Tris 20mM, cisteína 5 μ M y NaCl 130 mM a un pH de 7,8. Las muestras se fijaron con 5 μ l de una solución de paraformaldehído al 1,25% (p/v) en tampón Tris-HCl 0,5M, (pH 7,4). La mezcla se incubó a 4 °C durante 1 hora en oscuridad. Posteriormente, se depositaron sobre un portaobjetos 3 μ l de trietilnediamino 0,22M (DABCO, Sigma Chemical Co., Madrid, Spain) diluido en glicerol:PBS (9:1 v/v) junto con 6 μ l de cada muestra incubada con la solución de tinción. La función del DABCO es preservar la fluorescencia. Se colocó el cubreobjetos y se selló la preparación con esmalte de uñas. Todo el proceso se realizó en semioscuridad.

Las muestras se analizaron bajo un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E-400 equipado con filtro V-2A con el objetivo de inmersión (1000x), y los espermatozoides se clasificaron según su patrón de fluorescencia en no capacitados (NC, distribución de la fluorescencia en toda la cabeza, con o sin una banda ecuatorial brillante), capacitados (C, con fluorescencia en la porción anterior de la cabeza) o con el acrosoma reaccionado (R, no mostrando fluorescencia en la cabeza o solo una ligera señal en la zona ecuatorial) como se observa en la figura 4.3.

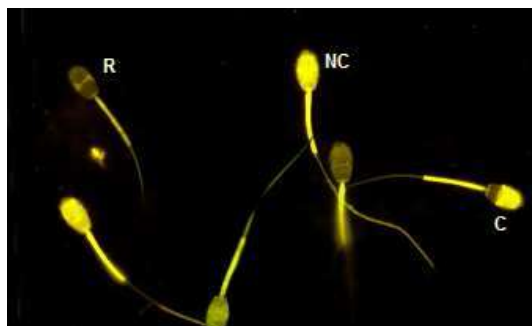


Figura 4.3.: Análisis del estado de capacitación de espermatozoides ovinos mediante tinción de CTC. Imagen de microscopía de fluorescencia con filtro V-2A y 1000 aumentos. Se pueden distinguir espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (C), y reaccionados (R).

4.6. Determinación de la distribución de actina por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Con la idea de estudiar si existen cambios en la distribución de actina en el citoesqueleto de los espermatozoides durante el proceso de capacitación se realizaron una serie de experimentos de inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo Anti-Actinantibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) producido en conejo.

Para la correcta visualización posterior de las muestras se ajustó la concentración espermática a 3×10^6 espermatozoides/ml. Para ello la muestra se diluyó con tampón PBS (NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM y KH_2PO_4 1,76 mM, pH 7,4) y se añadieron 50 μl de formaldehído 3,7% (v/v) para su fijación.

La mezcla se incubó durante 20 minutos en una rueda giratoria a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó 6 minutos a 900 x g y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 500 μl de PBS, se depositaron 40 μl de cada suspensión de células en un portaobjetos polilisinado (Superfrost Plus, ThermoFisherScientific, Waltham, MA, EEUU), sobre el que previamente se había delimitado una superficie cuadrangular con un lápiz de diamante y se dejó secar la gota a temperatura ambiente. Tras la adhesión de las células, los portaobjetos se lavaron 3 veces con PBS en agitación durante 5 minutos.

Tras el lavado se realizó la permeabilización de las muestras con Tritón X-100 al 0,5% en PBS. De esta forma el anticuerpo que se añadió posteriormente es capaz de penetrar en el interior celular. Se añadieron 40 μl de esta solución sobre cada muestra fijada en el portaobjetos y se dejó actuar durante 15 minutos.

Pasado este tiempo se realizaron otros 3 lavados de 5 minutos con PBS en agitación y a continuación se bloqueó con BSA al 5% en PBS depositando también 40 μl sobre cada muestra. El bloqueo se realizó durante al menos dos horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Este paso es crucial ya que de esta forma se evita que se produzcan uniones inespecíficas. Se volvieron a

lavar las muestras tres veces en PBS durante 5 minutos y, tras dejar que se secan, se añadió el anticuerpo primario anti-actina diluido 1:50 en PBS con BSA al 1%. Se dejó incubar toda la noche en cámara húmeda y a 4°C.

La mañana siguiente se lavaron las muestras de la misma forma que anteriormente y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 chicken anti-rabbit (ThermoFisherScientific, Waltham, MA, EEUU) diluido 1:600 en PBS con BSA al 1%, durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad.

Finalmente, se lavaron otras tres veces las muestras y tras dejarlas secar se montaron con DABCO 0,22 M en solución de glicerol:PBS(9:1 v/v) para disminuir la pérdida de fluorescencia. Las muestras se visualizaron utilizando un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E-400 equipado con filtro B-2A^a con el objetivo de inmersión (1000x). Se contabilizaron al menos 100 espermatozoides por cada muestra y se dividieron en grupos según el patrón de fluorescencia que presentaban. Se observaron 4 patrones distintos que se repetían en todos los experimentos realizados:

- Grupo 1 (**E**): Marcaje en la zona ecuatorial
- Grupo 2 (**AA**): Marcaje en la zona apical del acrosoma
- Grupo 3 (**E+AA**): Marcaje en la zona ecuatorial y en la zona apical del acrosoma
- Grupo 4 (**NEG**): Sin marcaje

4.7. Determinación de la polimerización de actina por unión a faloidina-FITC

La faloidina es una micotoxina del grupo de las falotoxinas producida por el hongo *Amanita phalloides*. Su mecanismo de acción se basa en la unión a la actina polimerizada, impidiendo su despolimerización e interfiriendo así en muchas de las funciones básicas de las células.

En la presente memoria se utiliza faloidina conjugada con isotiocianato de fluoresceína, (Phalloidin-FITC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) para

observar cambios en la polimerización de la actina durante el proceso de capacitación.

El proceso de preparación de las muestras es similar al empleado para la realización de la inmunofluorescencia indirecta.

En primer lugar se ajustó la concentración de las células a 3×10^6 cel/ml diluyéndola con tampón PBS y añadiendo 50 μ l de formaldehído 3,7% (v/v) para su fijación. La mezcla se incubó durante 20 minutos en una rueda giratoria a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó 6 minutos a 900 x g y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 500 μ l de PBS, se depositaron 40 μ l de cada suspensión de células en un portaobjetos polilisinado (Superfrost Plus, ThermoScientific), sobre el que previamente se había delimitado una superficie cuadrangular con un lápiz de diamante y se dejó secar la gota a temperatura ambiente. Tras la adhesión de las células, los portaobjetos se lavaron 3 veces con PBS en agitación durante 5 minutos.

Tras el lavado se permeabilizaron las muestras con Tritón X-100 al 0,5% (v/v) en PBS durante 15 minutos y se volvió a lavar. A continuación se llevó a cabo el bloqueo con BSA al 1% en PBS depositando 40 μ l sobre cada muestra. Incubamos durante diez minutos en cámara fría y en oscuridad. Tras volver a lavar se añadieron 40 μ l de faloidina-FITC 3 μ M sobre cada muestra y se incubó durante una hora en oscuridad a temperatura ambiente. Se repitió el lavado una última vez con PBS y se añadió una gota de DABCO 0,22 M en solución de glicerol:PBS, (9:1 v/v) para minimizar la pérdida de fluorescencia.

Las muestras se observaron en el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E-400 equipado con filtro B-2A^a con el objetivo de inmersión (1000x) y posteriormente fueron llevadas al Servicio de microscopía confocal del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA) para ser examinadas.

4.8. Detección de la fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas de membrana espermáticas por Western blotting

4.8.1. Extracción de proteínas espermáticas

Se procedió a extraer las proteínas de la membrana espermática por el método descrito por Colás y cols. (2008). A 200 µl de cada muestra ($1,6 \times 10^8$ células/ml) se les añadió 100 µl de un medio de extracción compuesto por 2% de SDS (dodecil sulfato sódico, p/v), Tris-HCl 0,0626 mM (pH 6,8), 0,002% de azul de bromofenol diluido en glicerol al 10 % (siendo la concentración final de glicerol del 1%), e inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU). La mezcla se incubó inmediatamente durante 5 minutos a 100 °C en baño de arena. Después se centrifugó a 13000 x g, 5 minutos, a temperatura ambiente y se recogió el sobrenadante, desechando el pellet formado. Finalmente, se añadieron 2-mercaptoetanol y glicerol, a una concentración final del 5% y el 1%, respectivamente, y los lisados se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis.

4.8.2. SDS-PAGE e *immunoblotting*

Las proteínas se separaron en una dimensión siguiendo el método Laemmli (1970), utilizando patrones de comparación de pesos moleculares, de 10 a 250 kDa (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Se utilizaron geles de acrilamida del 10% y las condiciones de electroforesis fueron 130 V durante 90 min. a 4 °C. Una vez separadas las proteínas, fueron transferidas a una membrana de Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA, EEUU), utilizando el módulo Mini Trans-Blot® de BioRad (BioRad, Hercules, CA, EEUU)

Una vez realizada la transferencia de las proteínas, los sitios de unión no específicos de las membranas se bloquearon incubándolas 1 hora con 5% BSA (w/v), a temperatura ambiente en un tampón PBS (NaCl 136 mM, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 1,44 g/l, KH₂PO₄ 0,24 g/l, pH 7,4).

La detección de la fosforilación de tirosinas de las proteínas se realizó mediante la incubación con el anticuerpo primario monoclonal antifosfotirosinas (clone 4G10®; Merck Millipore, Darmstadt, Alemania), diluido 1:1000 en PBS-

Tween (PBS con Tween-20 al 0,1% p/V) con 1% BSA al 1% (p/V) durante toda la noche a 4 °C.

Tras realizar tres lavados de 10 minutos de duración con PBS Tween, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario donkey anti-mouse Dylight800 conjugated antibody (Li-CorBiosciences, Lincoln, NE, EEUU) diluido 1/15000 en PBS-Tween con BSA al 1%, durante 75 minutos a temperatura ambiente y en semioscuridad. Finalmente, las membranas se escanearon utilizando el equipo OdysseyClx (Licor Biosciences Lincoln, NE, EEUU) y se cuantificó la señal para determinar la intensidad relativa de las bandas de fosfotirosinas de las proteínas con el mismo software de detección suministrado con el equipo.

4.9. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el software GraphPadInStat (versión 3.01; San Diego, CA, EEUU). Las diferencias estadísticas de motilidad, estado de capacitación y distribución de actina entre los distintos grupos experimentales se analizaron mediante el test de Chi-cuadrado, mientras que la fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas de membrana espermáticas se evaluó por análisis de varianza (ANOVA de una vía), tras comprobar la normalidad de los datos mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

Los resultados se muestran como la media \pm S.E.M. (error estándar de la media) del número de experimentos realizados en cada caso.

5. Resultados y discusión

Se evaluaron los efectos de la progesterona y el estradiol sobre la capacitación espermática analizando distintos fenómenos generalmente asociados a la misma, como cambios en el patrón de movimiento, en la distribución intracelular de calcio o en la fosforilación de residuos de tirosina. Posteriormente se analizaron posibles modificaciones en la organización del citoesqueleto de actina en espermatozoides incubados en presencia y ausencia de estas hormonas.

5.1. Efecto de la progesterona y el estradiol sobre la motilidad espermática.

Se evaluó el efecto de la progesterona y el estradiol en la motilidad espermática tras 3 horas de incubación en estufa a 39 °C, 5% de CO₂ y 100% de humedad (condiciones capacitantes).

Las muestras evaluadas se denominaron de la siguiente manera, sin dejar espacios entre cifras y concentraciones para una mejor visualización en las gráficas:

- **C3h**: control tras tres horas de incubación en medio TALP
- **1μME₂**: tras 3 horas de incubación en medio TALP + estradiol 1 μM
- **100pME₂**: 3 horas de incubación en medio TALP + estradiol 100 pM
- **1μMP₄**: tras 3 horas de incubación en medio TALP + progesterona 1 μM
- **100pMP₄**: tras 3h de incubación en medio TALP + progesterona 100pM

Se utilizó el sistema CASA para la evaluación de la motilidad espermática y se comparó la motilidad total y la motilidad progresiva de las muestras con respecto a la muestra control, que contiene únicamente medio TALP.

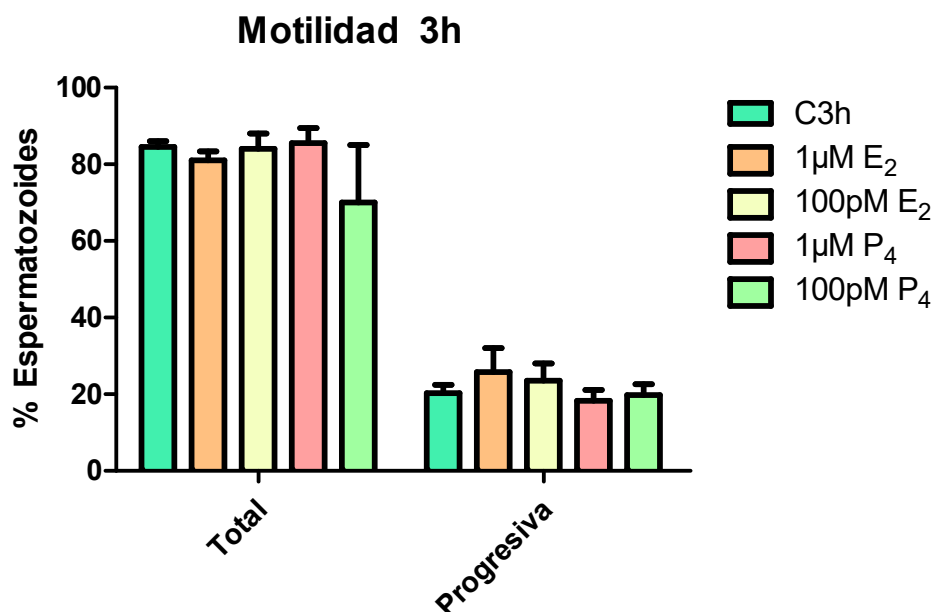


Figura 5.1: Motilidad total y progresiva tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO₂), de espermatozoides ovinos en medio TALP (C) y en medio TALP con dos concentraciones distintas de progesterona y estradiol (1 µM y 100 pM). Los resultados, expresados en porcentaje, se muestran como media ± SEM de 4 experimentos.

Como se aprecia en la figura 5.1 la motilidad espermática total no presentó cambios estadísticamente significativos tras la incubación con ninguna de las dos hormonas, aunque se aprecia un descenso del porcentaje de espermatozoides móviles totales en la muestra incubada con progesterona 100 pM (70 ± 15,1% vs. 84,5 ± 1,5% para 100pMP₄ y C3h, respectivamente).

En cuanto a la motilidad progresiva, se observó un ligero incremento de la misma tras la incubación con estradiol (23,5 ± 4,5% y 25,75 ± 6,3% para 100pME₂ y 1µME₂, respectivamente) con respecto a la muestra incubada en medio TALP (20,25 ± 2,2%), sin llegar a ser estadísticamente significativo en ninguno de los casos. En relación a la progesterona, el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva fue similar al control para ambas concentraciones de hormona (20,25 ± 2,2%, 18,25 ± 2,8% y 19,75 ± 2,8% para C3h, 1µMP₄ y 100pMP₄, respectivamente).

La hiperactivación espermática es, como ya se ha comentado, un cambio en el patrón de movimiento asociado con la capacitación. Este cambio implica una disminución en el porcentaje de espermatozoides con movimiento

progresivo, ya que la hiperactivación se caracteriza por un batido mucho más asimétrico del flagelo, lo que da lugar a un movimiento en círculos o con un patrón en forma de ocho (Yanagimachi, 1994). El hecho de que las muestras incubadas con estradiol presenten un mayor porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva que el control, podría indicar que la incubación con esta hormona da lugar a un menor porcentaje de espermatozoides hiperactivados. Estos resultados apoyarían la idea de que el estradiol inhibe la hiperactivación espermática planteada por otros autores en otras especies (Fujinoki and Takei, 2015). En cuanto a la progesterona, al no mostrar efectos significativos en la motilidad progresiva, podríamos concluir que ésta no tendría influencia en la hiperactivación espermática en la especie ovina, a pesar de haber sido descrita por algunos autores como estimulante de la misma en otras especies (Roldan *et al.*, 1994; Harper *et al.*, 2004). No obstante habría que llevar a cabo un análisis más profundo de los parámetros cinéticos agrupando a los espermatozoides en subpoblaciones (análisis de componentes principales, PCA) para tener un conocimiento mayor del efecto de estas hormonas sobre el movimiento espermático y la hiperactivación. Este estudio se está llevando a cabo actualmente en nuestro grupo de investigación en colaboración con otros grupos.

A pesar de que la hiperactivación espermática es un efecto asociado a la capacitación, y de que ambos procesos ocurren generalmente de manera simultánea de forma fisiológica, algunos autores también han descrito que ambos fenómenos pueden producirse de manera independiente (Ho and Suarez, 2001), por lo que la ausencia de este tipo de movimiento no indicaría necesariamente que no se haya producido capacitación.

5.2. Efecto de las hormonas en la distribución intracelular de calcio

La tinción con clorotetraciclina proporciona unos patrones específicos asociados a la capacitación espermática, y nos permite diferenciar espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (C) y aquellos que han sufrido la reacción acrosómica (R).

La incubación con las hormonas esteroideas produjo cambios significativos en los porcentajes de los distintos subtipos de espermatozoides observados tras la tinción con CTC (Fig. 5.2.)

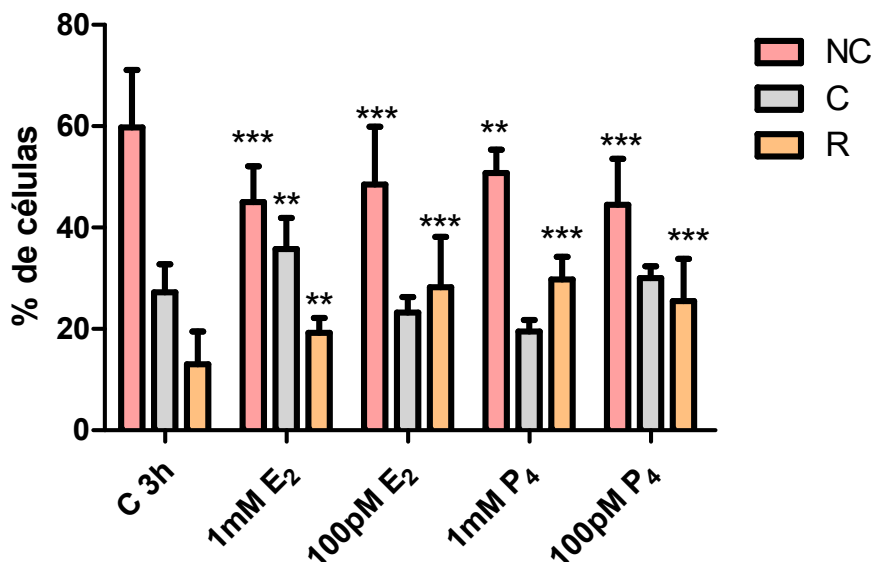


Figura 5.2.: Porcentaje de espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (C) y reaccionados (R) evaluados por tinción con clorotetraciclina (CTC) tras la incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO₂), en medio TALP (C3h) y en medio TALP con dos concentraciones distintas de progesterona y estradiol (1 μM y 100 pM). Los resultados se muestran como media ± SEM de 5 experimentos. *** P<0,001; **P<0,01 con respecto a C3h

El porcentaje de espermatozoides no capacitados (NC) disminuyó significativamente tras la incubación con las dos concentraciones de progesterona (50,75 ± 4,6% y 44,5 ± 9,0% para 1μMP₄ y 100pMP₄, respectivamente) así como de estradiol (45,0 ± 7,0% para 1μME₂ y 48,5 ± 11,4% para 100pME₂) en comparación con la muestra control incubada en las mismas condiciones (59,75 ± 11,4% para C3h).

Sólo la incubación con 1μM de estradiol dio lugar a un incremento significativo (P<0,01) en el porcentaje de espermatozoides capacitados (C) en comparación con la muestra control (35,75 ± 6,1% vs. 27,25 ± 5,5% para 1μME₂ y C3h, respectivamente). En el resto de las muestras no se apreciaron diferencias (30 ± 2,3% para 100pMP₄) o un ligero descenso (19,5 ± 2,2% y

23,25 ± 3,0% para 1μMP₄ y 100pME₂, respectivamente) con respecto al control, pero en ningún caso significativo.

Estos resultados podrían indicar que una baja concentración de estradiol inhibiría la capacitación espermática mientras que a altas concentraciones de esta hormona este proceso se vería favorecido. Teniendo en cuenta que en el tracto reproductor femenino la concentración de estradiol va en aumento hasta alcanzar su concentración más alta en las proximidades del ovocito (Sagare-Patil *et al.*, 2012), una inducción de la capacitación debida a altas concentraciones de estradiol sería beneficioso para el espermatozoide, ya que experimentaría los cambios asociados a este proceso en las cercanías del ovocito y no antes.

Por otro lado la progesterona pareció no ejercer efectos significativos sobre la capacitación espermática, lo que concuerda con los resultados expuestos por otros autores, que no fueron capaces de demostrar un efecto favorable de los medios enriquecidos con progesterona sobre la capacitación espermática (Therien and Manjunath, 2003; Neild *et al.*, 2005).

Sin embargo, el porcentaje de espermatozoides reaccionados (R) presentó un incremento estadísticamente significativo para las dos concentraciones de ambas hormonas, siendo la concentración más alta de progesterona (1μM) la que presentó un mayor porcentaje de espermatozoides reaccionados con respecto al control (29,75 ± 4,5% vs. 13,0 ± 6,5% para 1μMP₄ y C3h, respectivamente). Esto podría confirmar una relación positiva entre la progesterona y la reacción acrosómica, ya que esta hormona se ha relacionado con la entrada de calcio al interior celular (Bedu-Addo *et al.*, 2007), un paso clave en la liberación de las enzimas hidrolíticas del interior del acrosoma. La muestra incubada con la concentración más alta de estradiol (1μM) fue la que mostró un menor incremento del porcentaje de espermatozoides reaccionados con respecto al control (19,25 ± 2,9).

5.3. Evaluación de la fosforilación de residuos de tirosina mediante western blotting

La fosforilación de residuos de tirosina es otro marcador generalmente asociado con la capacitación espermática (Visconti *et al.*, 1995). En este trabajo se evaluó dicha fosforilación mediante *western-blotting*.

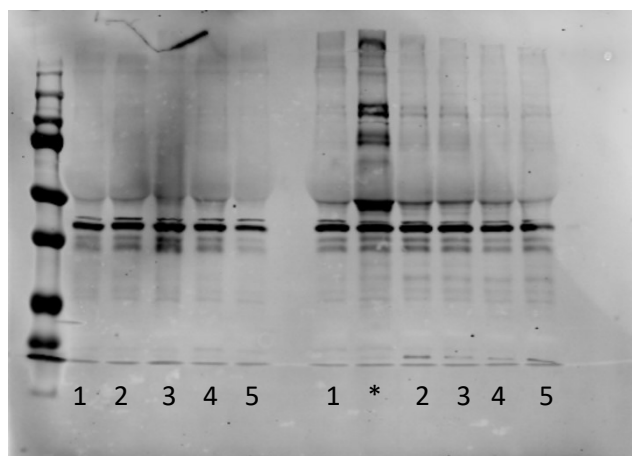


Figura 5.3: *Western-blot* representativo de la fosforilación en residuos de tirosinas de las proteínas de membrana de espermatozoides incubados durante 3 horas en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO₂) en medio TALP sin hormonas (1, control), con estradiol 1 μM (2), o 100 pM (3), o con progesterona 1 μM (4); o 100 pM (5). Proteínas de membrana espermatozoides incubados en un medio TALP con alto contenido en AMPc (inductor de la capacitación) se utilizaron como control positivo (*). En este *western-blot* se analizaron las proteínas espermáticas de dos experimentos diferentes.

La figura 5.3 corresponde a una membrana representativa los análisis de *western-blot* realizados. En ella se puede observar una mayor intensidad de señal correspondiente a proteínas fosforiladas en residuos de tirosinas en el carril señalado con un *. Esta muestra fue incubada en un medio con alto contenido en AMPc que induce fuertemente la capacitación espermática en el espermatozoide ovino, y se utilizó como control positivo de capacitación aunque no fue tomada en cuenta para el análisis cuantitativo.

El análisis densitométrico de las bandas, representado en la figura 5.4. reveló un ligero aumento en la fosforilación de residuos de tirosina en la muestra incubada con la concentración más alta de progesterona (1 μM) con respecto a la muestra control, mientras que con la concentración más baja de

esta hormona (100pM) se observó una disminución de la fosforilación, si bien ninguno de estos resultados es estadísticamente significativo. En el caso de las muestras incubadas con estradiol, tampoco se apreció ninguna diferencia con respecto al control.

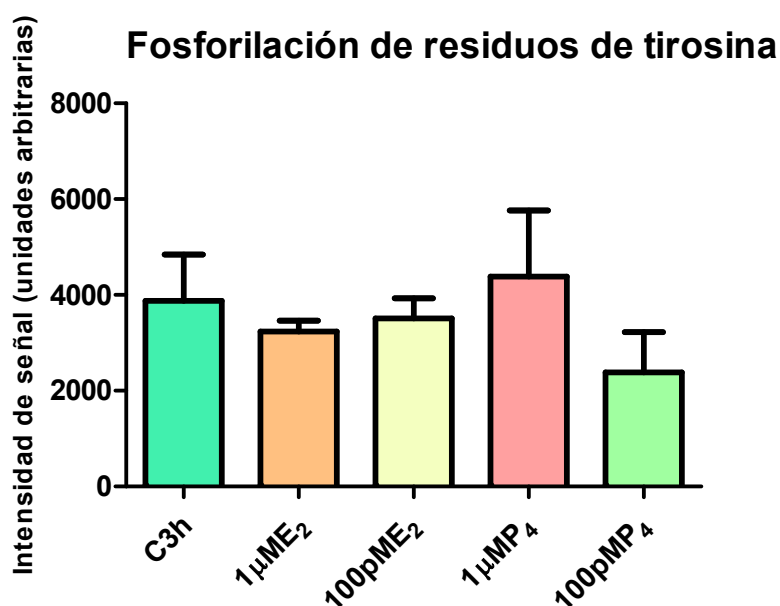


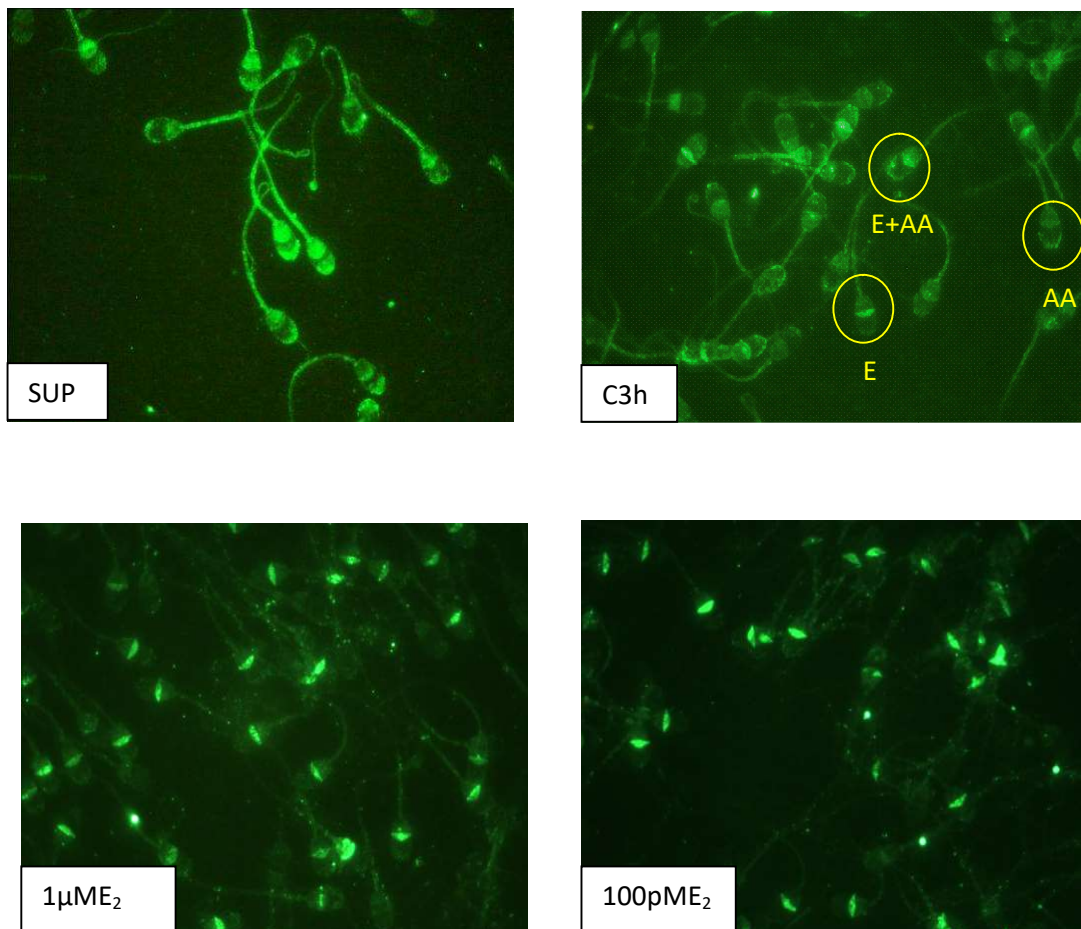
Figura 5.4.: Cuantificación densitométrica (unidades arbitrarias) de la fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas espermáticas de muestras incubadas en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO₂), en medio TALP (C3h) y en medio TALP con una concentración 1µM de estradiol (1µME₂), 100pM de estradiol (100pME₂), 1µM de progesterona(1µMP₄) y 100pM de progesterona (100pMP₄). Los valores se representan como media ± S.E.M. (n=4)

En el caso de la incubación con estradiol 1µM, sería esperable un incremento en la fosforilación de tirosinas, ya que en estas muestras se había observado un mayor porcentaje de espermatozoides capacitados, evaluados mediante tinción con clorotetraciclina, con respecto al control. Como ya se ha comentado, la fosforilación de residuos de tirosina es un evento asociado a la capacitación (Visconti *et al.*, 1995), pero esta capacitación es un proceso secuencial que ocurre en varias fases. Es posible, por tanto, que se haya producido el cambio en la distribución intracelular de calcio que provocaría el cambio en el patrón de fluorescencia detectado mediante la tinción con CTC, pero que todavía no se haya producido la fosforilación de residuos de tirosina. Esto podría explicar la falta de concordancia entre los resultados obtenidos por

una y otra técnica. Sin embargo, no debemos olvidar que tanto progesterona como estradiol, a las dos concentraciones ensayadas, también provocan, un aumento en el porcentaje de espermatozoides reaccionados, evaluados por CTC, y esta reacción acrosómica se ha asociado también con una disminución en la fosforilación de residuos de tirosina (Grasa *et al.*, 2006). Por tanto, la concurrencia de ambos fenómenos podría dificultar la interpretación de los resultados.

5.4. Determinación de la distribución de actina por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI):

En la figura 5.5 se recoge una serie de imágenes representativas de la distribución del citoesqueleto de actina en las distintas muestras experimentales, evaluadas mediante inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo primario anti-actina.



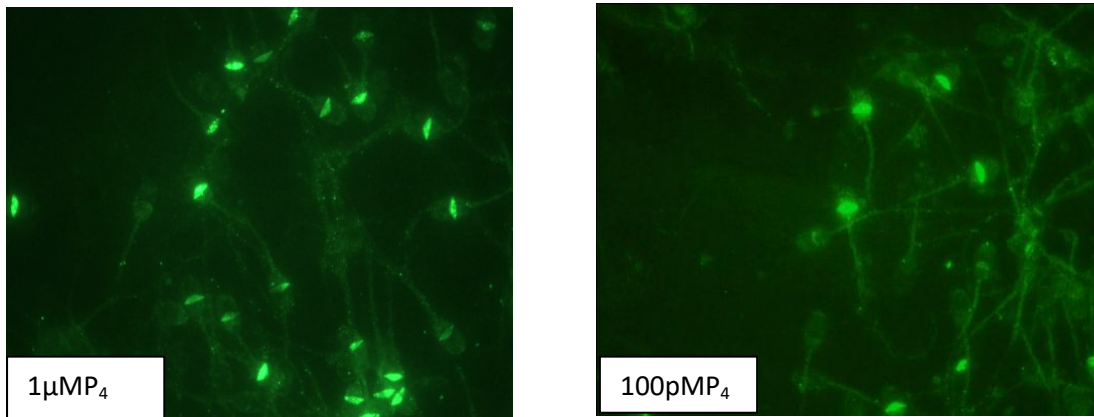


Figura 5.5.: Imágenes representativas (1000x) de la distribución de actina, obtenidas mediante inmunofluorescencia directa con un anticuerpo anti-actina en espermatozoides obtenidos por *swim-up* (SUP) e incubados durante 3 horas en condiciones capacitantes en medio TALP (C3h) y en medio TALP con una concentración 1µM de estradiol (1µME₂), 100pM de estradiol (100pME₂), 1µM de progesterona (1µMP₄) y 100pM de progesterona (100pMP₄).

Tras la observación al microscopio de fluorescencia, los patrones de distribución de actina de los espermatozoides se agruparon en cuatro inmunotipos:

- Grupo 1 (**E**): Marcaje en la zona ecuatorial
- Grupo 2 (**AA**): Marcaje en la zona apical del acrosoma
- Grupo 3 (**E+AA**): Marcaje en la zona ecuatorial y en la zona apical del acrosoma
- Grupo 4 (**NEG**): Sin marcaje

El porcentaje de espermatozoides de cada subgrupo evaluados en cada grupo experimental se representa en la figura 5.6.

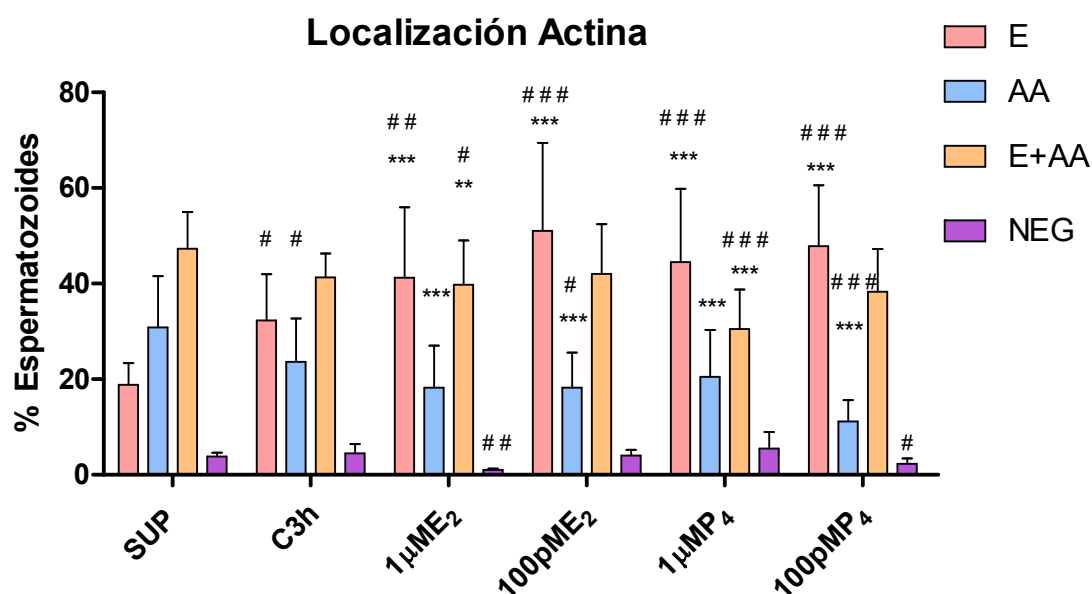


Figura 5.6.: Evaluación del porcentaje de los distintos inmunotipos espermáticos, evaluados por inmunofluorescencia indirecta de la localización de actina en la banda ecuatorial (E), en la región apical del acrosoma (AA), en ambas (E+AA) o en ninguna (NEG), en muestras obtenidas por *swim-up* (SUP) e incubadas durante 3 horas en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO₂) en medio TALP (C3h) y en medio TALP con una concentración 1µM de estradiol (1µME₂), 100pM de estradiol (100pME₂), 1µM de progesterona (1µMP₄) y 100pM de progesterona (100pMP₄). Los valores se representan como media ± S.E.M. (n=6). *** P<0,001; **P<0,01; *P<0,05 con respecto al Control 3h. ###P<0,001; ##P<0,01; #P<0,05 con respecto al *swim-up*.

Como se observa en la figura 5.6 existen diferencias estadísticamente significativas en el patrón de inmunolocalización de actina entre los distintos grupos experimentales.

El número de espermatozoides que presentaron marcaje sólo en la zona ecuatorial (E) aumentó de forma estadísticamente significativa en todas las muestras incubadas con hormonas esteroideas con respecto a la muestra *swim-up* (SUP) y con respecto al control, siendo el aumento más alto en la muestra incubada con 100 pM de estradiol (51,00 ± 18,4% vs. 32,33 ± 9,6% y 18,83 ± 4,5% para 100pME₂, C y SUP respectivamente), seguido de la incubada con 100 pM de progesterona (47,83 ± 12,7%).

Del mismo modo, también se produjo un descenso estadísticamente significativo en el porcentaje de espermatozoides que presentaron

fluorescencia en la zona apical del acrosoma (AA), sobre todo con las concentraciones bajas de ambas hormonas ($18,20 \pm 7,3\%$ para 100pME_2 y $11,17 \pm 4,1\%$ para 100pMP_4) con respecto a la muestra control ($23,67 \pm 9,1\%$) y *swim-up* ($30,83 \pm 10,7\%$).

Finalmente, con respecto al porcentaje de espermatozoides que presentan marcaje en ambas zonas (E+AA), éste se mantuvo más o menos constante con respecto al control, si bien se apreció descenso significativo en la muestra incubada con $1\mu\text{M}$ de progesterona con respecto a la muestra *swim-up* ($30,5 \pm 8,2\%$ vs. $47,33 \pm 7,6\%$ para $1\mu\text{MP}_4$ y SUP, respectivamente) y la muestra control ($41,33 \pm 4,9\%$), y un descenso algo menor pero también significativo en la muestra incubada con estradiol $1\mu\text{M}$ ($39,8 \pm 9,2\%$).

A la vista de estos resultados se podría concluir que la incubación de muestras espermáticas ovinas con hormonas esteroideas y en condiciones capacitantes produciría una reorganización del citoesqueleto de actina en estas células.

Si comparamos estos resultados con los obtenidos por tinción con clorotetraciclina, también se podría relacionar los espermatozoides que solo presentan marcaje en la zona ecuatorial (E), con los espermatozoides que han sufrido la reacción acrosómica (R).

Como se ha comentado en el apartado 5.3., el porcentaje de espermatozoides reaccionados aumentaba en el control con respecto al *swim-up*, y en las muestras incubadas con hormonas con respecto al control (Figura 5.2.), siendo este aumento más significativo en las muestras incubadas con progesterona ($1\mu\text{M}$ y 100pM) y con la concentración más baja de estradiol (100pM). De la misma forma, el porcentaje de espermatozoides que pierden inmunofluorescencia frente a actina en la zona apical y que presentan fluorescencia exclusivamente en la zona ecuatorial (E) aumenta en el control con respecto al *swim-up*, y en las muestras incubadas con hormonas con respecto al control. Igualmente, el mayor porcentaje de espermatozoides con este tipo de marcaje se observa en las muestras incubadas con la concentración más baja de estradiol (100pM) y con ambas concentraciones de

progesterona (1 μ M y 100pM), lo que coincidiría con los resultados de CTC y avalaría esta hipótesis.

La reacción acrosómica cursa con una fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa para que se produzca la liberación de enzimas hidrolíticas. Varios autores han demostrado que existe relación entre la reorganización del citoesqueleto de actina y la reacción acrosómica (Brener et al., 2003; Azamar et al., 2007), con lo que resultaría lógica una pérdida de marcaje por inmunofluorescencia de la actina en la zona apical de la cabeza del espermatozoide en aquellos espermatozoides que hayan experimentado dicho proceso.

5.5. Determinación de la polimerización de actina por unión a faloidina-FITC

Con objeto de profundizar en los cambios en el citoesqueleto de actina en condiciones capacitantes, con y sin hormonas, se llevaron a cabo una serie de experimentos utilizando faloidina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) para observar cambios en la polimerización de la actina.

Las muestras fueron analizadas mediante microscopía confocal y en la Figura 5.7 se recogen alguna de las imágenes obtenidas.

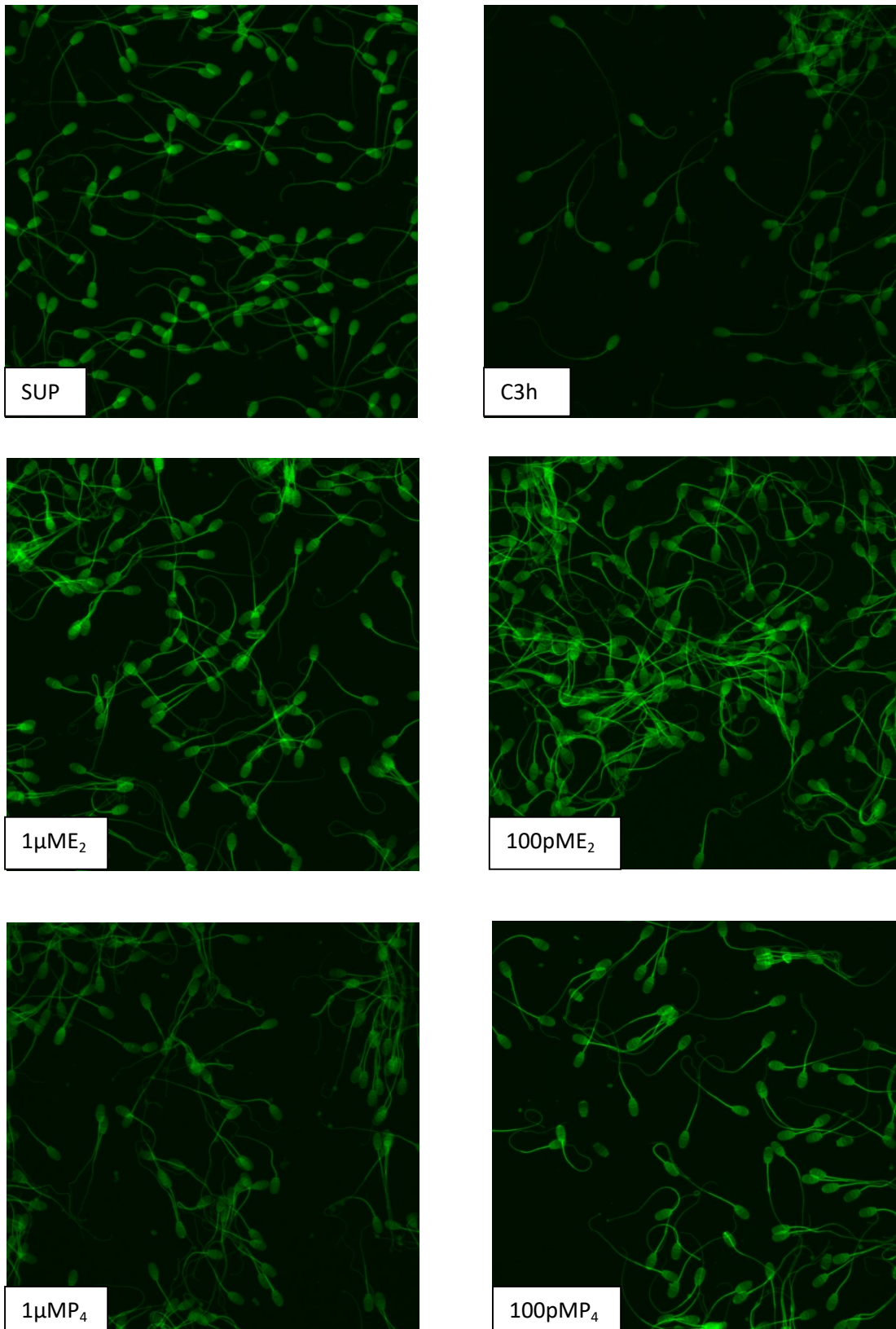


Figura 5.7: Espermatozoides teñidos con faloidina-FITC y evaluados mediante microscopía confocal a 600x aumentos, correspondientes a muestras obtenidas por *swim-up* (SUP) e incubadas durante 3 horas en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO₂) en medio TALP (C3h) y en medio TALP con una concentración 1µM de estradiol (1µME₂), 100pM de estradiol (100pME₂), 1µM de progesterona (1µMP₄) y 100pM de progesterona (100pMP₄).

Todas las muestras teñidas con faloidina-FITC y evaluadas por microscopía confocal presentaban un mismo patrón de fluorescencia, que incluía toda la cabeza y flagelo del espermatozoide, con mayor intensidad en la zona del segmento ecuatorial y la zona post-acrosomal. También se observó un ligero marcaje en la zona apical (Figura 5.8.).

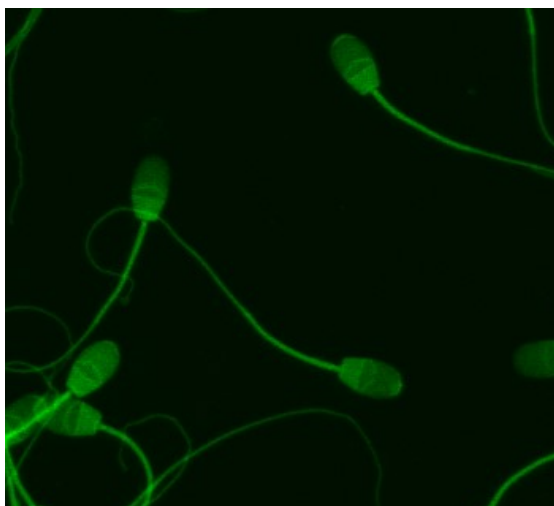


Figura 5.8.: Detalle de la tinción con faloidina-FITC evaluada mediante microscopía confocal a 600x aumentos. La imagen corresponde a una muestra incubada con 1 μ M de estradiol pero, debido a la ausencia de diferencias entre los distintos grupos experimentales, se considera representativa de todas las muestras. Se observa tinción en cabeza y cola del espermatozoide con un mayor intensidad en la zona del segmento ecuatorial, en la zona post-acrosomal y en la zona apical.

El análisis por imagen de las muestras estudiadas no mostró cambios significativos en el patrón de fluorescencia. Esto parece indicar que no se produjeron cambios en la polimerización de actina en la incubación con ninguna de las hormonas ni respecto al control ni respecto a la muestra *swim-up*. Esto no concuerda con los resultados esperados ya que se ha demostrado que tanto la capacitación como la reacción acrosómica están regulados por la polimerización y despolimerización de la actina (Brener *et al.*, 2003; Bernabò *et al.*, 2011; Saponaro *et al.*, 2012).

Dado que todos los espermatozoides presentaban el mismo patrón de tinción, independientemente del grupo experimental, no se realizó ningún estudio cuantitativo.

6. Conclusiones

1. La incubación con progesterona o con estradiol en condiciones capacitantes no dio lugar a cambios en el porcentaje de espermatozoides móviles totales o con motilidad progresiva para ninguna de las dos concentraciones estudiadas (1 μ M y 100pM).
2. La incubación con estradiol a una concentración 1 μ M en condiciones capacitantes aumentó significativamente el porcentaje de espermatozoides capacitados.
3. La incubación con progesterona o con estradiol en condiciones capacitantes aumentó significativamente el porcentaje de espermatozoides que sufren la reacción acrosómica, a las dos concentraciones ensayadas (1 μ M y 100pM).
4. La incubación con progesterona o con estradiol en condiciones capacitantes a las dos concentraciones ensayadas (1 μ M y 100pM) provocó cambios en la organización del citoesqueleto de actina.

6. Conclusions

1. None of progesterone or estradiol concentrations assayed (100 pM and 1 μ M) affected the percentage of motile or hiperactivated sperm, compared with capacitated samples without hormone.
2. Incubation with 1 μ M of estradiol resulted in a significant increase of the percentage of capacitated sperm.
3. Incubation with both progesterone and estradiol significantly increased the percentage of acrosome-reacted for both concentration assayed (100 pM and 1 μ M).
4. Incubation with progesterone or estradiol for both concentration assayed (100 pM and 1 μ M) resulted in significant changes in the reorganization of actin cytoskeleton.

7. Bibliografía

- Adeoya-Osiguwa, S. A., S. Markoulaki, V. Pocock, S. R. Milligan and L. R. Fraser (2003). "17beta-Estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function." Hum Reprod**18**(1): 100-107.
- Alvarez, J. G., J. L. Lasso, L. Blasco, R. C. Nunez, S. Heyner, P. P. Caballero and B. T. Storey (1993). "Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime." Hum Reprod**8**(7): 1087-1092.
- Azamar, Y., S. Uribe and A. Mujica (2007). "F-actin involvement in guinea pig sperm motility." Mol Reprod Dev**74**(3): 312-320.
- Baldi, E., M. Luconi, M. Muratori, S. Marchiani, L. Tamburrino and G. Forti (2009). "Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions." Mol Cell Endocrinol**308**(1-2): 39-46.
- Bedu-Addo, K., C. L. Barratt, J. C. Kirkman-Brown and S. J. Publicover (2007). "Patterns of [Ca²⁺]_i mobilization and cell response in human spermatozoa exposed to progesterone." Dev Biol**302**(1): 324-332.
- Bernabò, N., P. Berardinelli, A. Mauro, V. Russo, P. Lucidi, M. Mattioli and B. Barboni (2011). "The role of actin in capacitation-related signaling: an in silico and in vitro study." BMC Systems Biology**5**(1): 47.
- Brener, E., S. Rubinstein, G. Cohen, K. Shternall, J. Rivlin and H. Breitbart (2003). "Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction." Biol Reprod**68**(3): 837-845.
- Calzada, L. (1988). "[Effect of steroid hormones on the membrane potential of human spermatozoa]." Ginecol Obstet Mex**56**: 104-109.
- Carson, G. D. and J. R. Challis (1981). "Maternal steroid changes after fetal death until delivery of the dead sheep fetus." Can J Physiol Pharmacol**59**(2): 168-172.
- Caswell, A. H. and J. D. Hutchison (1971). "Selectivity of cation chelation to tetracyclines: evidence for special conformation of calcium chelate." Biochem Biophys Res Commun**43**(3): 625-630.

- Colas, C., P. James, L. Howes, R. Jones, J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2008). "Cyclic-AMP initiates protein tyrosine phosphorylation independent of cholesterol efflux during ram sperm capacitation." Reprod Fertil Dev**20**(6): 649-658.
- Cheng, F. P., B. M. Gadella, W. F. Voorhout, A. Fazeli, M. M. Bevers and B. Colenbrander (1998). "Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor." Biol Reprod**59**(4): 733-742.
- De Amicis, F., C. Guido, I. Perrotta, P. Avena, S. Panza, S. Ando and S. Aquila (2011). "Conventional progesterone receptors (PR) B and PRA are expressed in human spermatozoa and may be involved in the pathophysiology of varicocele: a role for progesterone in metabolism." Int J Androl**34**(5 Pt 1): 430-445.
- Ded, L., N. Sebkova, M. Cerna, F. Elzeinova, P. Dostalova, J. Peknicova and K. Dvorakova-Hortova (2013). "In vivo exposure to 17beta-estradiol triggers premature sperm capacitation in cauda epididymis." Reproduction**145**(3): 255-263.
- Eddy, E. M., T. F. Washburn, D. O. Bunch, E. H. Goulding, B. C. Gladen, D. B. Lubahn and K. S. Korach (1996). "Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility." Endocrinology**137**(11): 4796-4805.
- Ericsson, R. J. (1967). "A fluorometric method for measurement of sperm capacitation." Proc Soc Exp Biol Med**125**(4): 1115-1118.
- Filippi, S., M. Luconi, S. Granchi, L. Vignozzi, S. Bettuzzi, P. Tozzi, F. Ledda, G. Forti and M. Maggi (2002). "Estrogens, but not androgens, regulate expression and functional activity of oxytocin receptor in rabbit epididymis." Endocrinology**143**(11): 4271-4280.
- Fujinoki, M. (2010). "Suppression of progesterone-enhanced hyperactivation in hamster spermatozoa by estrogen." Reproduction**140**(3): 453-464.
- Fujinoki, M. and G. L. Takei (2015). "Estrogen suppresses melatonin-enhanced hyperactivation of hamster spermatozoa." J Reprod Dev**61**(4): 287-295.
- Gadella, B. M., P. S. Tsai, A. Boerke and I. A. Brewis (2008). "Sperm head membrane reorganisation during capacitation." Int J Dev Biol**52**(5-6): 473-480.

- Garcia-Lopez, N., M. Ollero, J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (1996). "Reversion of thermic-shock effect on ram spermatozoa by adsorption of seminal plasma proteins revealed by partition in aqueous two-phase systems." J Chromatogr B Biomed Appl**680**(1-2): 137-143.
- Gautier, C., I. Barrier-Battut, I. Guenon, D. Goux, C. Delalande and H. Bouraima-Lelong (2016). "Implication of the estrogen receptors GPER, ESR1, ESR2 in post-testicular maturation of equine spermatozoa." Gen Comp Endocrinol**233**: 100-108.
- González-Arto, M., et al., (2013). "Receptores de progesterona y estrógeno β en el espermatozoide ovino y su correlación con la capacitación, in XV Jornadas sobre Producción Animal de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (AIDA) ".
- Grasa, P., J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2006). "Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation." Reproduction**132**(5): 721-732.
- Grasa, P., R. Perez-Pe, O. Baguena, F. Forcada, A. Abecia, J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2004). "Ram sperm selection by a dextran/swim-up procedure increases fertilization rates following intrauterine insemination in superovulated ewes." J Androl**25**(6): 982-990.
- Gray, S. L., B. R. Lackey and W. R. Boone (2016). "Effects of Panax ginseng, zearalenol, and estradiol on sperm function." J Ginseng Res**40**(3): 251-259.
- Guidobaldi, H. A., M. E. Teves, D. R. Unates, A. Anastasia and L. C. Giojalas (2008). "Progesterone from the cumulus cells is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus complex." PLoS One**3**(8): e3040.
- Harper, C. V., C. L. Barratt and S. J. Publicover (2004). "Stimulation of human spermatozoa with progesterone gradients to simulate approach to the oocyte. Induction of $[Ca^{2+}]_i$ oscillations and cyclical transitions in flagellar beating." J Biol Chem**279**(44): 46315-46325.
- Ho, H. C. and S. S. Suarez (2001). "Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation." Reproduction**122**(4): 519-526.

- Ikawa, M., N. Inoue, A. M. Benham and M. Okabe (2010). "Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte." J Clin Invest**120**(4): 984-994.
- Jin, S. K. and W. X. Yang (2016). "Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated?" Oncotarget**27**(10): 12274.
- Katz, D. F., T. D. Bloom and R. H. BonDurant (1981). "Movement of bull spermatozoa in cervical mucus." Biol Reprod**25**(5): 931-937.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature**227**(5259): 680-685.
- Lin, M., R. Hess and R. J. Aitken (2002). "Induction of sperm maturation in vitro in epididymal cell cultures of the tammar wallaby (*Macropus eugenii*): disruption of motility initiation and sperm morphogenesis by inhibition of actin polymerization." Reproduction**124**(1): 107-117.
- Lishko, P. V., I. L. Botchkina and Y. Kirichok (2011). "Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm." Nature**471**(7338): 387-391.
- Luconi, M., G. Forti and E. Baldi (2006). "Pathophysiology of sperm motility." Front Biosci**11**: 1433-1447.
- Mendes Maia, T., P. Paul-Gilloteaux and R. Basto (2015). "Quantitative analysis of flagellar proteins in *Drosophila* sperm tails." Methods Cell Biol**127**: 263-278.
- Mortimer, D. (1994). "Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity." Reprod Fertil Dev**6**(1): 25-31.
- Mortimer, D. and S. T. Mortimer (1992). "Methods of sperm preparation for assisted reproduction." Ann Acad Med Singapore**21**(4): 517-524.
- Muratori, M., M. Luconi, S. Marchiani, G. Forti and E. Baldi (2009). "Molecular markers of human sperm functions." Int J Androl**32**(1): 25-45.
- Neild, D. N., B. M. Gadella, A. Agüero, T. A. Stout and B. Colenbrander (2005). "Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm." Anim Reprod Sci**89**(1-4): 47-56.
- Ollero, M., T. Muino-Blanco, M. J. Lopez-Perez and J. A. Cebrian-Perez (1996). "Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations." Int J Androl**19**(5): 287-292.

- Osman, R. A., M. L. Andria, A. D. Jones and S. Meizel (1989). "Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction." Biochem Biophys Res Commun**160**(2): 828-833.
- Palecek, J., J. Peknicova and M. Vitu (1999). "Changes in immunochemical localization of cytoskeletal proteins in human and boar spermatozoa before and after acrosome reaction." Folia Biol**45**(1): 13-20.
- Pina-Medina, A. G., V. Hansberg-Pastor, A. Gonzalez-Arenas, M. Cerbon and I. Camacho-Arroyo (2016). "Progesterone promotes cell migration, invasion and cofilin activation in human astrocytoma cells." Steroids**105**: 19-25.
- Rago, V., F. Giordano, E. Brunelli, D. Zito, S. Aquila and A. Carpino (2014). "Identification of G protein-coupled estrogen receptor in human and pig spermatozoa." J Anat**224**(6): 732-736.
- Razandi, M., A. Pedram, G. L. Greene and E. R. Levin (1999). "Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells." Mol Endocrinol**13**(2): 307-319.
- Roldan, E. R., T. Murase and Q. X. Shi (1994). "Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida." Science**266**(5190): 1578-1581.
- Romarowski, A., G. M. Luque, F. A. La Spina, D. Krapf and M. G. Buffone (2016). "Role of Actin Cytoskeleton During Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis." Adv Anat Embryol Cell Biol**220**: 129-144.
- Sagare-Patil, V., M. Galvankar, M. Satiya, B. Bhandari, S. K. Gupta and D. Modi (2012). "Differential concentration and time dependent effects of progesterone on kinase activity, hyperactivation and acrosome reaction in human spermatozoa." Int J Androl**35**(5): 633-644.
- Saponaro, I., N. Bernabò, G. Todisco, P. Lucidi and P. Berardinelli (2012). Role of Actin in Spermatozoa Function Through Biological Network Theory. Veterinary Science: Current Aspects in Biology, Animal Pathology, Clinic and Food Hygiene. A. Pugliese, A. Gaiti and C. Boiti. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 33-37.

- Sebkova, N., M. Cerna, L. Ded, J. Peknicova and K. Dvorakova-Hortova (2012). "The slower the better: how sperm capacitation and acrosome reaction is modified in the presence of estrogens." Reproduction**143**(3): 297-307.
- Sirivaidyapong, S., M. M. Bevers, B. M. Gadella and B. Colenbrander (2001). "Induction of the acrosome reaction in dog sperm cells is dependent on epididymal maturation: the generation of a functional progesterone receptor is involved." Mol Reprod Dev**58**(4): 451-459.
- Teves, M. E., F. Barbano, H. A. Guidobaldi, R. Sanchez, W. Miska and L. C. Giojalas (2006). "Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa." Fertil Steril**86**(3): 745-749.
- Therien, I. and P. Manjunath (2003). "Effect of progesterone on bovine sperm capacitation and acrosome reaction." Biol Reprod**69**(4): 1408-1415.
- Vigil, P., A. Toro and A. Godoy (2008). "Physiological action of oestradiol on the acrosome reaction in human spermatozoa." Andrologia**40**(3): 146-151.
- Visconti, P. E., J. L. Bailey, G. D. Moore, D. Pan, P. Olds-Clarke and G. S. Kopf (1995). "Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation." Development**121**(4): 1129-1137.
- Visconti, P. E., V. A. Westbrook, O. Chertihin, I. Demarco, S. Sleight and A. B. Diekman (2002). "Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity." J Reprod Immunol**53**(1-2): 133-150.
- Wang, Y., R. Storeng, P. O. Dale, T. Abyholm and T. Tanbo (2001). "Effects of follicular fluid and steroid hormones on chemotaxis and motility of human spermatozoa in vitro." Gynecol Endocrinol**15**(4): 286-292.
- Ward, C. R. and B. T. Storey (1984). "Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay." Dev Biol**104**(2): 287-296.
- Wessel, L., L. Olbrich, B. Brand-Saberi and C. Theiss (2014). "New aspects of progesterone interactions with the actin cytoskeleton and neurosteroidogenesis in the cerebellum and the neuronal growth cone." J Histochem Cytochem**62**(12): 835-845.
- Yamano, S., J. Yamazaki, M. Irahara, A. Tokumura, K. Nakagawa and H. Saito (2004). "Human spermatozoa capacitated with progesterone or a long

incubation show accelerated internalization by an alkyl ether lysophospholipid." Fertil Steril**81**(3): 605-610.

Yanagimachi, R. (1994). "Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity." Zygote**2**(4): 371-372.

Younis, A. I., K. A. Zuelke, K. M. Harper, M. A. Oliveira and B. G. Brackett (1991). "In vitro fertilization of goat oocytes." Biol Reprod**44**(6): 1177-1182.

Zaneveld, L. J., C. J. De Jonge, R. A. Anderson and S. R. Mack (1991). "Human sperm capacitation and the acrosome reaction." Hum Reprod**6**(9): 1265-1274.

Effects of 17-β estradiol and progesterone on ram sperm functionality

Gimeno, S.; Del Molino, L.; Casao, A.; Cebrián-Pérez, J.A. Muiño-Blanco, T. and Pérez-Pé, R.



Dpto. Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA). Facultad de Veterinaria.

Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza



INTRODUCTION

Steroid hormones, such as estrogens and progesterone, play a crucial role in regulation of reproductive events in mammals. The presence of receptors for 17-β estradiol and progesterone on the mammal sperm surface leads to speculate about a relevant role on sperm functionality. However, the information about their specific effects on ovine spermatozoa is scarce. Our group has detected the presence of receptors for these hormones in ram sperm and therefore the central aim of this study was to investigate the effect of different estradiol and progesterone concentrations on several parameters related to the functionality of ovine spermatozoa, such as motility, membrane integrity, capacitation state and changes in cytoskeletal organization.

MATERIALS AND METHODS

Swim-up-selected spermatozoa ($4 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$) were diluted in TALP medium and incubated with three different doses (1 μM, 10 nM or 100 pM) of progesterone (P4) or estradiol (E2) for 3 h at 39 °C under 5% CO₂ and saturated humidity. As both hormones were dissolved in PBS with DMSO, a control group containing the same DMSO concentration (0.1%) was included.

Methods used:

- ❖ Sperm membrane integrity was assessed by fluorescent staining with 6-CFDA and propidium iodide (PI) and analysed by flow cytometry.
- ❖ Computer-assisted sperm motility analysis (CASA) was performed using the ISAS 1.0.4 software (Proiser SL).
- ❖ Capacitation state was evaluated by CTC (chlortetracycline) visualized by fluorescence microscopy and quantification of phosphorylated proteins (Western Blot analysis using a monoclonal mouse antibody anti-phosphotyrosine).
- ❖ Changes in cytoskeletal organization were evidenced by indirect immunofluorescence assays (IIF) using an anti-actin antibody and visualized by fluorescence microscopy.

RESULTS & CONCLUSIONS

The results obtained showed that the incubation with different concentration of P4 or E2 did not affect the percentage of sperm with progressive motility or integral plasma membrane (PI-) (not showed in poster). However, incubation with these hormones at 100 pM and 1 μM resulted in a decreased non-capacitated sperm (CTC staining, $p < 0.01$) rate, concomitant with a higher ($p < 0.01$) percentage of acrosome-reacted sperm compared with control samples (Fig. 1). A densitometric study of the effect on protein tyrosine phosphorylation showed that the incubation with both hormones did not reveal any significant changes in protein tyrosine phosphorylation (Fig. 2), although in general there was a decrease in signal of those samples that showed an increment in acrosome-reacted CTC-subtype. The immunolocalization of actin on ram spermatozoa showed significant changes due to incubation with hormones. The sperm immunotype AA (reactivity in apical region of the acrosome) decreased after 3 h of incubation with hormones at 39 °C and 5% CO₂ respect control samples ($p < 0.01$). (Fig. 3).

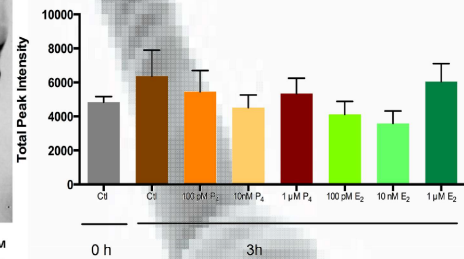
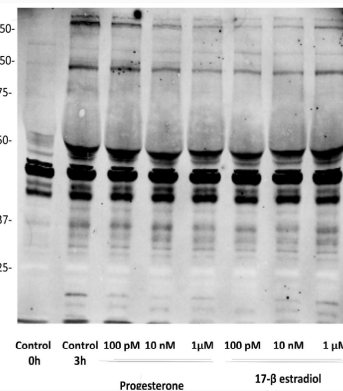
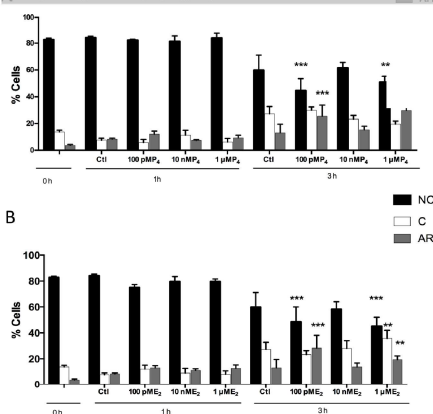
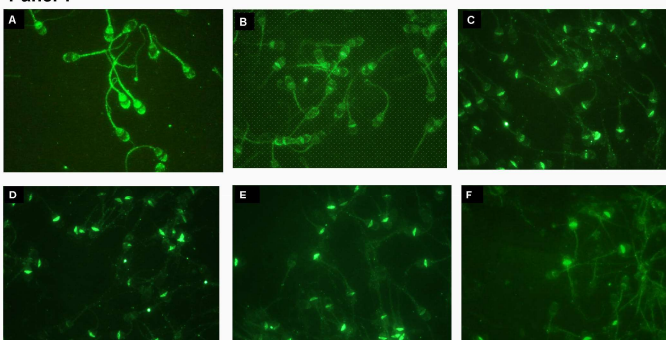


Fig. 1. Percentage of non-capacitated (NC), capacitated (C) and acrosome-reacted (AR) spermatozoa evaluated by CTC staining in a free-seminal plasma sample before incubation (0h) and in samples treated with different progesterone (P4) and 17-β estradiol (E2) or without this compounds (control) after 1 and 3 h incubation at 39 °C and 5% CO₂. Values are expressed as mean ± SEM (n=4). Significant differences comparing with control sample at 3 h ** P<0.1 and *** P<0.001.

Fig. 2. Western blot and densitometric quantification analysis of total phosphorylated proteins (phosphotyrosines) in a free-seminal plasma sample before incubation (0h) and in samples treated with different progesterone (P4) and 17-β estradiol (E2) or without this compounds (control) after 3 h of incubation at 39 °C and 5% CO₂. Lanes: (1), control 0 h; (2), control 3 h; (3), 100 pM P4; (4), 10 nM P4; (5), 1 μM P4; (6) 100 pM E2; (7), 10 nM E2; (8), 1 μM E2. Values are expressed as mean ± SEM (n=6).

Panel 1



Panel 2

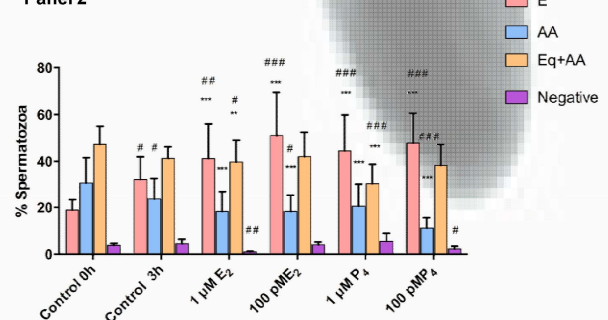


Fig. 3. Panel 1. Representative images of immunolocalization of actin by IIF in ram spermatozoa (a) control 0 h, (b) control 3 h, (c) 1 μM E2, (d) 100 pM E2, (e) 1 μM P4 and (f) 100 pM P4 after 3 h of incubation at 39 °C and 5% CO₂. Panel 2. Percentage of different immunotypes observed in the above-mentioned samples. Values are expressed as mean ± SEM (n=6). Significant differences comparing with control sample at 0 h ### P<0.001 and with control at 3 h *** P<0.001. Actin location are related to signal distribution (E, reactivity at the equatorial region; AA, reactivity at apical region of the acrosome; E+AA, reactivity at the equatorial and apical region of the acrosome; N, not fluorescence).

In conclusion, the incubation of ram spermatozoa with steroid hormones led to an increment in the percentage of acrosome reacted sperm together with changes in cytoskeletal organization