



Universidad  
Zaragoza



# Efecto del estradiol sobre la funcionalidad del espermatozoide ovino

Autor:

Jorge Peinado Izaguerri

Directoras:

Rosaura Pérez Pé

M<sup>a</sup> Teresa Muiño Blanco

Departamento de Bioquímica y Biología  
Molecular y Celular

Grado en Biotecnología

Septiembre 2016

Trabajo Fin de  
Grado

La Dra. Rosaura Pérez Pé, Profesora Titular, y la Dra. M<sup>a</sup> Teresa Muiño Blanco, Catedrática, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza

INFORMAN:

Que el alumno D. Jorge Peinado Izaguerri, ha realizado bajo nuestra dirección, en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, su Trabajo Fin de Grado titulado “Efecto del estradiol sobre la funcionalidad del espermatozoide ovino”. Este trabajo cumple los objetivos recogidos en las Directrices de TFG en Biotecnología, por lo que se considera procedente su presentación.

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos la presente en Zaragoza a 14 de septiembre de 2016.



Rosaura Pérez Pé



M<sup>a</sup> Teresa Muiño Blanco

Parte de los resultados derivados del presente Trabajo Fin de Grado han sido aceptados para su presentación como póster en el 20th Annual ESDAR (European Society for Domestic Animal Reproduction) Conference que se celebrará en Lisboa (Portugal) del 27 al 29 de Octubre de 2016. Se incluye como anexo el resumen enviado y aceptado.

**Título: “An implemented dextran/swim-up technique with estradiol for the separation of a sperm subpopulation enriched in non-capacitated with no phosphatidylserine exposure cells”**

Autores: T.Muiño-Blanco, **J.Peinado**, P.Nadal, S.Gimeno, A.Casao, J.Cebrián-Pérez and R.Pérez-Pé.

## **ÍNDICE**

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
2.1 Estrógenos y reproducción. El estradiol.....	3
2.2 Efectos del estradiol sobre el espermatozoide.....	4
2.3 Direccionalidad espermática.....	6
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>8</b>
4.1 Obtención de las muestras seminales.....	8
4.2 Efecto de la presencia de estradiol en el medio de recogida de swim-up.....	8
4.2.1. Separación espermática ( <i>Swim-up/Dextrano</i> ) y diseño experimental.....	8
4.2.2 Cálculo de la concentración y del porcentaje de recuperación espermática.....	9
4.2.3 Evaluación de la motilidad espermática.....	10
4.2.4 Evaluación de la integridad de la membrana plasmática (Viabilidad).....	10
4.2.5 Análisis de la translocación de fosfatidilserina en la membrana plasmática.....	11
4.2.6 Evaluación del estado de capacitación.....	11
4.2.6.1 Tinción con clorotetraciclina.....	11
4.2.6.2 Evaluación de la fosforilación en residuos de tirosinas mediante Western Blot.....	12
4.2.7 Determinación de la distribución del receptor E <sub>2</sub> β por inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	13
4.3 Influencia del estradiol sobre la orientación espermática.....	14
4.4 Análisis estadístico.....	15
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>16</b>
5.1 Efecto sobre los espermatozoides de la presencia de estradiol en el medio de recogida de swim-up.....	16
5.1.1 Concentración y porcentaje de recuperación.....	16
5.1.2 Evaluación de la motilidad espermática.....	17
5.1.3 Análisis de la integridad de la membrana plasmática (Viabilidad).....	17
5.1.4 Análisis de la translocación de fosfatidilserina (FS) en la membrana plasmática.....	17
5.1.5 Evaluación del estado de capacitación.....	18
5.1.5.1 Tinción con clorotetraciclina.....	18
5.1.5.2 Evaluación de la fosforilación en residuos de tirosinas.....	20
5.1.6 Determinación de la distribución del receptor E <sub>2</sub> β por inmunofluorescencia indirecta.....	20
5.2 Influencia del estradiol sobre la orientación espermática.....	22
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>24</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>24</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>25</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>28</b>

## **1. RESUMEN**

El estradiol ( $E_2$ ) es una hormona esencial en la reproducción de los mamíferos, pero además de su acción genómica a nivel sistémico, también puede ejercer rápidas acciones no genómicas sobre los espermatozoides ya que se encuentra presente en el tracto reproductor femenino y los espermatozoides presentan receptores para esta hormona. Entre las acciones propuestas podría encontrarse la modulación de un fenómeno clave como es la capacitación espermática, que es el conjunto de cambios que sufre el espermatozoide en el tracto reproductor femenino y que le confieren capacidad fecundante. También podría jugar un papel relevante en la supervivencia espermática o incluso sobre su movimiento guiado hacia el ovocito mediante quimiotaxis. Hasta la fecha no existen estudios sobre la influencia del  $E_2$  en la funcionalidad espermática de la especie ovina, ni evidencias sobre su capacidad quimioatrayente.

En base a estos antecedentes en este trabajo se planteó como objetivo principal estudiar el efecto del estradiol sobre el movimiento y la direccionalidad de los espermatozoides ovinos, así como en la funcionalidad de los mismos.

Para ello se llevaron a cabo dos abordajes experimentales. El primero consistió en la inclusión de estradiol a dos concentraciones distintas (100 pM y 1  $\mu$ M) en la capa de recogida de un medio de selección espermática, para valorar su influencia sobre el porcentaje de recuperación celular, así como la funcionalidad y el grado de exposición del receptor de estradiol en los espermatozoides recuperados. El segundo se centró en el estudio de la capacidad quimiotáctica del  $E_2$  usando para ello una cámara específica y un software de análisis de direccionalidad de movimiento desarrollado en nuestro grupo.

La inclusión de estradiol en la capa de recogida dio lugar a un incremento significativo del porcentaje de recuperación celular con respecto al método estándar sin hormonas. Además el porcentaje de espermatozoides capacitados y con exposición de fosfatidilserina recuperados fue significativamente menor que en el eyaculado. La concentración de 1  $\mu$ M provocó también un incremento en la cantidad de espermatozoides que presentan el receptor de estradiol  $\beta$  en su región apical. Sin embargo, no se observaron cambios en la motilidad, integridad de membrana o fosforilación en residuos de tirosina. Se demostró también la capacidad quimiotáctica del  $E_2$  sobre espermatozoides ovinos capacitados *in vitro*.

## **ABSTRACT**

Estradiol ( $E_2$ ) is an essential hormone in mammalian reproduction but, in addition to its genomic actions at a systemic level, it can also act through rapid non-genomic actions in spermatozoa since it can be found in the female reproductive tract and spermatozoa have receptors that respond to it. Some of these actions could be the modulation of a key process such as spermatid capacitation, that is the combination of changes that spermatozoa undergo in the female reproductive tract and that give it its fertilizing capability. Estradiol could also be crucial for sperm survival or even in its movement towards the oocyte by chemotaxis. Up to now, there are no studies about the  $E_2$  effect on sperm functionality in ram spermatozoa, or about its chemotactic capacity.

Because of these previous observations the main objective of this project was to study the effect of  $E_2$  on ram sperm movement, directionality and functionality.

With this aim, we carried out two ways of action. The first of them was the inclusion of two different estradiol concentrations (100 pM and 1  $\mu$ M) in the upper layer of a sperm selection method with the objective of evaluating its influence in ram sperm recovery rate, functionality and amount of estradiol receptor exposure in the selected sperm. The second was focused on the study of  $E_2$  chemotactic capacity using a special camera and an analytical software developed by our group.

The presence of estradiol in the upper layer resulted in a significant increase in the sperm recovery rate compared to the standard method without hormone. In addition, the percentage of capacitated spermatozoa and their phosphatidylserine exposure was lower than in the ejaculate. The concentration of 1  $\mu$ M caused also an increase in the amount of ram spermatozoa showing the estradiol receptor  $\beta$  at their apical region. However, no changes were observed in motility, membrane integrity or phosphorylation of protein tyrosine residues. The  $E_2$  chemotactic capacity in ram spermatozoa capacitated *in vitro* was also proven.

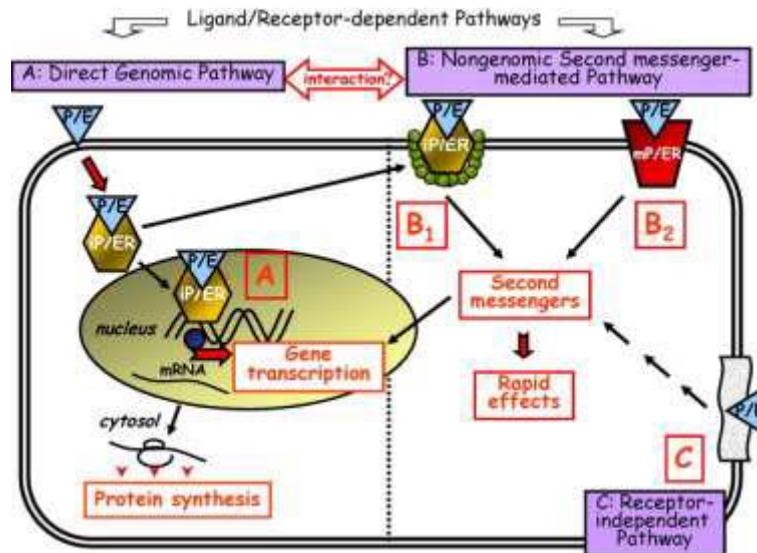
## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1 Estrógenos y reproducción. El estradiol**

Los estrógenos son hormonas sexuales esteroideas, derivadas del colesterol, que juegan un papel fundamental en la regulación de los procesos reproductivos en mamíferos, y entre ellas podemos encontrar la progesterona (PG) y el 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) o estradiol. Su mecanismo de acción principal y tradicionalmente conocido es el de la regulación de la expresión génica en el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal mediada por receptores nucleares, con efectos en distintos órganos y tejidos. Destaca su papel reproductivo, regulatorio del ciclo estral en las hembras y relacionado con la fertilidad en los machos. Pero además, también existe un mecanismo de acción no genómica de estas hormonas sobre varios tipos celulares, dando lugar a diversas respuestas en intervalos de tiempo mucho menores que mediante la vía genómica, y mediado principalmente por receptores presentes en la membrana plasmática (Bishop y Stormshak, 2008).

El estradiol es producido en distintos lugares del organismo tales como la corteza suprarrenal o el tejido adiposo, pero destaca sobre todo en las hembras su producción en las gónadas, concretamente en las células de la granulosa ováricas y en los machos en las células de Leydig testiculares. El estradiol (al igual que la progesterona) se puede encontrar en el tracto reproductor femenino, en el fluido folicular y en las cercanías del ovocito a concentraciones micromolares (Wang *et al.*, 2001), sin embargo la concentración exacta de E<sub>2</sub> a lo largo del tracto reproductor femenino es muy complicada de estimar debido a la influencia de factores como el momento del ciclo estral y estadio de las células de la granulosa o las diferencias entre las distintas especies, existiendo probablemente un gradiente de concentración desde las proximidades del ovocito hasta las zonas más distales así como ocurre con la progesterona (Sagare-Patil *et al.*, 2012).

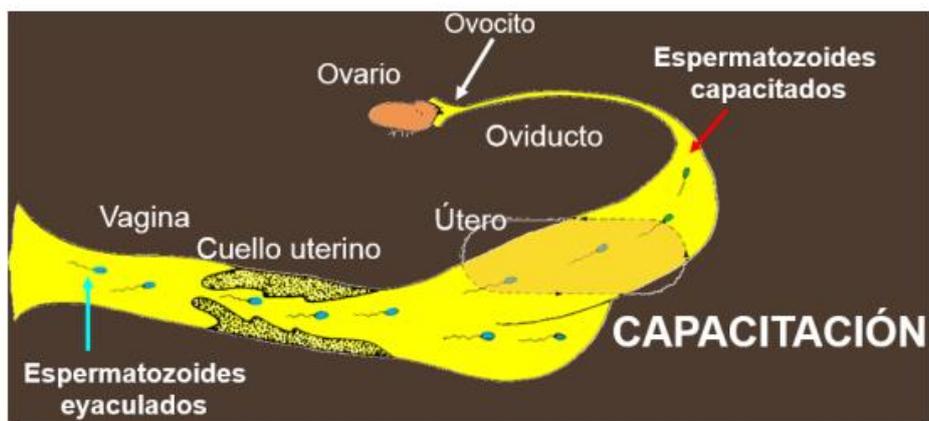
Se ha visto la capacidad tanto del E<sub>2</sub> como de la PG de regular de manera no genómica la funcionalidad de los espermatozoides, puesto que son células transcripcionalmente inactivas que sufren un gran número de cambios en poco tiempo dentro de un ambiente en el que estas hormonas están presentes (Baldi *et al.*, 2009). La forma en la que el E<sub>2</sub> ejerce estas rápidas acciones no-genómicas sobre los espermatozoides no se conoce totalmente todavía. Bien podría ser a través del pequeño porcentaje de receptores nucleares que son translocados a la membrana externa y se localizan en caveolas, o bien por medio de otros receptores totalmente distintos (Baldi *et al.*, 2009) (Fig 2.1). En los últimos años numerosos trabajos han evidenciado la presencia de diversos receptores en la membrana plasmática de los espermatozoides de distintas especies, diferenciándose hasta cuatro tipos: un receptor de andrógenos (AR), receptores de estradiol  $\alpha$  (ER1, receptor nuclear clásico) y  $\beta$  (ER2, nuevo receptor directamente relacionado con la actividad no genómica del E<sub>2</sub>) y un receptor ligado a una proteína G intracelular (GPER) (Aquila *et al.*, 2004; Arkoun *et al.*, 2014; Rago *et al.*, 2007; Rago *et al.*, 2014; Solakidi *et al.*, 2005). La presencia del receptor ER2 o Er $\beta$  en espermatozoides ovinos ha sido descrita por nuestro grupo de investigación (Casao *et al.*, 2011).



**Figura 2.1:** Mecanismos de acción propuestos para los estrógenos sobre el espermatozoide. A) Ruta genómica clásica B) Ruta no genómica mediada por mensajeros secundarios mediante el receptor nuclear clásico presente en caveolas (B1) o mediante otros receptores de membrana (B2) C) Ruta no mediada por receptor (No evidencia experimental) (Baldi *et al.*, 2009).

## 2.2 Efectos del estradiol sobre el espermatozoide

Para que los espermatozoides sean capaces de fecundar al ovocito, deben de llevar a cabo una serie de procesos entre los que se encuentran la capacitación, la adquisición de movimiento hiperactivado y la reacción acrosómica. La capacitación espermática (Figura 2.2) es un proceso imprescindible que conlleva cambios en la membrana plasmática (Gadella y Harrison, 2002), movimientos de calcio intracelular (Lishko *et al.*, 2011) y activación de diferentes rutas de señalización celular (Grasa *et al.*, 2006; Tulsiani *et al.*, 2007). Al final de este proceso el espermatozoide adquiere un movimiento de hiperactivación caracterizado por una motilidad progresiva y unos movimientos desordenados de cabeza y flagelo, y finalmente sufre la reacción acrosómica, proceso de exocitosis que permite al espermatozoide penetrar la zona pelúcida del ovocito.



**Figura 2.2:** Esquema del tracto genital de la hembra donde se produce la capacitación

Para hablar de los efectos del estradiol sobre el espermatozoide, es imprescindible hablar de la acción de la progesterona, ya que el actual debate en torno al papel del estradiol se centra en la posibilidad de que inhiba o module los efectos de la progesterona, o bien lleve a cabo otros efectos distintos.

La principal acción descrita de la progesterona es la de favorecer la capacitación y la reacción acrosómica (Lishko *et al.*, 2011; Romarowski *et al.*, 2016), mediada básicamente por un incremento del calcio intracelular (Baldi *et al.*, 2009). Además se ha demostrado en ratón (Roldan *et al.*, 1994) y en humano (Sagare-Patil *et al.*, 2012) que la progesterona sería capaz de inducir el patrón de movimiento característico de los espermatozoides capacitados (hiperactivación). En cuanto al estradiol, como ya hemos comentado, la información es contradictoria. En referencia a la hiperactivación se ha demostrado en hámster que el estradiol no tiene ningún efecto directo sobre ella, si bien es capaz de suprimir la acción favorecedora que ejerce la progesterona (Fujinoki, 2010). En cuanto a la capacitación, diversos estudios llevados a cabo tanto en ratón (Sebkova *et al.*, 2012), como en humano (Vigil *et al.*, 2008) concluyeron que la presencia de estradiol disminuye la probabilidad del espermatozoide de sufrir la capacitación y la reacción acrosómica, independientemente de la presencia de progesterona. Sin embargo otros grupos de investigación no han observado una acción directa del estradiol sobre la reacción acrosómica más allá de la inhibición de la acción de la progesterona (Luconi *et al.*, 1999).

En contraposición a estos efectos inhibitorios encontramos estudios que describen un aumento en la capacitación espermática y la reacción acrosómica en espermatozoides incubados con estradiol en la especie murina (Adeoya-Osiguwa *et al.*, 2003; Ded *et al.*, 2013) y porcina (Ded *et al.*, 2010).

Resumiendo, podríamos decir que el receptor  $E_2\beta$  está relacionado con una rápida acción no genómica del estradiol relacionada con la modificación de la concentración de calcio intracelular que va a afectar a los procesos de capacitación y reacción acrosómica, posiblemente interfiriendo con la acción de la progesterona (Baldi *et al.*, 2009; Fujinoki *et al.*, 2016).

En cuanto a la motilidad y viabilidad, estudios iniciales postularon que la presencia de estradiol mantenía la motilidad y viabilidad en el tracto reproductor femenino (Hunter, 1988; Wang *et al.*, 2001). Sin embargo, en bovino se vió posteriormente que el estradiol a bajas concentraciones produce un aumento de la motilidad espermática (Cifti y Zulkadir, 2010), hecho que concuerda con otro estudio realizado en humanos que establece una mejor función mitocondrial espermática en presencia de estradiol (Kotwicka *et al.*, 2016).

Por último también se ha descrito que el estradiol es capaz de proteger a los espermatozoides frente al proceso de apoptosis, fundamentado principalmente en la disminución de la translocación de fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática (Aquila *et al.*, 2004). Sin embargo, algunos autores consideran este fenómeno como uno más de los procesos que se dan durante la capacitación espermática, más que como un marcador de apoptosis (Gadella y Harrison, 2002; Harrison y Vickers, 1990; Kurz *et al.*, 2005).

Lamentablemente, solo existe un estudio que haya analizado la funcionalidad espermática en ovino tras la incubación con estradiol (García-Alvarez *et al.*, 2015), y en él no se observó ningún cambio con respecto al control, ni tan siquiera en la capacitación. Los propios autores atribuyen estos resultados al hecho de que los espermatozoides procedían de muestras criopreservadas, por lo cual sus receptores de membrana se podían haber visto alterados.

### **2.3 Direccionalidad espermática**

La orientación espermática en el oviducto parece ser crucial para el encuentro de los espermatozoides con el ovocito. En la especie humana se han propuesto tres mecanismos distintos que podrían regular este fenómeno: termotaxis basada en la respuesta a un gradiente de temperatura (Bahat y Eisenbach, 2006), reotaxis basada en el flujo de fluido (Miki y Clapham, 2013) y quimiotaxis basada en un gradiente de concentración (Armon y Eisenbach, 2011). Estos mecanismos, al menos en la especie humana, tienen en común la necesidad de que el espermatozoide esté capacitado y adquiera el movimiento de hiperactivación (Perez-Cerezales *et al.*, 2015).

En relación con la quimiotaxis, se han postulado diferentes sustancias presentes en el fluido folicular o secretadas por las células del cúmulus que rodean al ovocito (Bahat y Eisenbach, 2006) como quimioatrayentes para espermatozoides de distintas especies de mamíferos. Sin embargo, es poco probable que las sustancias presentes en el fluido folicular sean las responsables de la quimiotaxis *in vivo*, dado que este sólo se libera en el momento de la ovulación y no es capaz de mantener un gradiente de concentración. Es más probable, por tanto, que las sustancias quimioatrayentes estén producidas por las células del cúmulus, situando a la progesterona como la sustancia candidata a ejercer el mayor papel quimioatrayente, papel que ya ha sido probado en algunas especies como humano y conejo (Guidobaldi *et al.*, 2008; Teves *et al.*, 2006). Pero no debemos obviar el papel de otras sustancias también presentes en el tracto reproductor femenino, y que podrían ser también buenas candidatas como quimioatrayentes. Entre ellas se encuentran otras hormonas esteroideas como el estradiol, con una concentración a lo largo del tracto femenino parecida a la de la progesterona y que, como ella está relacionada con la regulación del calcio en el espermatozoide. De hecho se ha postulado el canal de calcio CatSper del espermatozoide como el responsable de la acción quimiotáctica de la progesterona (Lishko *et al.*, 2011), aunque de momento no hay datos sobre el mecanismo de acción del estradiol.

### **3.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

El estradiol es una hormona esteroidea presente en el fluido folicular y en las cercanías del ovocito ya que es secretado por las células de la granulosa que lo rodean (Wang *et al.*, 2001). Se ha descrito la capacidad de esta hormona para actuar mediante mecanismos no-genómicos en distintos tipos celulares (Bishop y Stormshak, 2008), posiblemente a través de distintos receptores. Como ya se ha comentado, nuestro grupo de investigación ha descrito la existencia del receptor para estrógeno E<sub>2</sub>β en espermatozoides de la especie ovina (Casao *et al.*, 2011).

Por otra parte, hay que resaltar la presencia de esta hormona en el tracto reproductor femenino, formando un posible gradiente de concentración y su capacidad para modular la capacitación en algunas especies, hecho relevante en el fenómeno de orientación espermática (Perez-Cerezales *et al.*, 2015). Estos hechos convierten al estradiol en un buen candidato para actuar como quimioatrayente espermático.

Tomando como base los antecedentes anteriormente citados, la hipótesis que se plantea en este trabajo es que el estradiol, por medio de receptores de membrana, regula la funcionalidad del espermatozoide ovino mediante mecanismos de acción no genómicos, y que puede ser una sustancia quimioatrayente para los mismos.

Por consiguiente los objetivos del actual trabajo fueron:

1. Evaluar la influencia de la adición de E<sub>2</sub> en el medio de recogida de un método de separación de espermatozoides ovinos sobre la recuperación y funcionalidad espermática, y la distribución del receptor E<sub>2</sub>β en la superficie de los espermatozoides seleccionados.
2. Estudiar el posible efecto quimioatrayente del E<sub>2</sub> sobre espermatozoides ovinos frescos y capacitados *in vitro*.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Obtención de las muestras seminales**

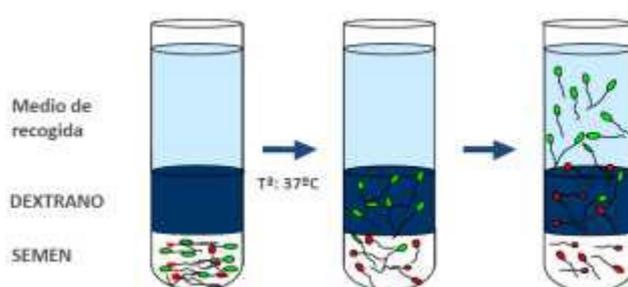
El semen utilizado en los experimentos se obtuvo a partir de morruecos adultos pertenecientes a la Asociación Nacional de ganaderos de la raza *Rasa Aragonesa* (ANGRA), estabulados en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Zaragoza. Los sementales se dividieron en dos grupos de tres animales cada uno, de tal forma que la frecuencia de extracción fuese de días alternos.

El método utilizado para la obtención del semen fue el de vagina artificial y se obtuvieron dos eyaculados consecutivos por morrueco. Se mezclaron todos los eyaculados obtenidos ese día para evitar diferencias individuales entre sementales y además tener una cantidad de semen suficiente para llevar a cabo los experimentos. Estas muestras se transportaron a 37 °C hasta el laboratorio y se mantuvieron a esta temperatura hasta su uso.

### **4.2. Efecto de la presencia de estradiol en el medio de recogida de *swim-up***

#### **4.2.1. Separación espermática (*Swim-up/Dextrano*) y diseño experimental**

La eliminación del plasma seminal de una muestra espermática es conveniente para evitar tanto el efecto perjudicial que éste ejerce sobre los espermatozoides (Mortimer, 1994), como la influencia que puedan tener sus componentes en los resultados obtenidos. La técnica de separación denominada *swim-up/dextrano*, puesta a punto en nuestro laboratorio para la especie ovina (García-López *et al.*, 1996), permite eliminar el plasma seminal y restos celulares de los eyaculados a la vez que seleccionar una población espermática con alta viabilidad y motilidad. Esto se consigue mediante la adición de un medio con alta concentración de dextrano (MS-Dextrano) sobre el eyaculado. De esta forma, sólo los espermatozoides con buena motilidad y membrana intacta (viables) van a ser capaces de atravesarla, concentrándose en el medio que constituye la capa superior y que estará libre de plasma seminal. (Figura 4.1).



**Figura 4.1:** Esquema de la técnica de separación espermática *swim-up/dextrano*

El medio utilizado (García-López *et al.*, 1996) está compuesto por NaCl 50 mM, KCl 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,4 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,7 mM, NaHCO<sub>3</sub> 4 mM, glucosa 2,8 mM, HEPES 21 mM, piruvato sódico 0,3 mM, lactato sódico 18,6 mM y sacarosa 200 mM. Se añadieron penicilina (1,5 UI/ml) y estreptomicina (15 µg/ml) para evitar la contaminación y el pH se ajustó a 6,5.

Para la realización de la técnica se colocaron cuidadosamente 0,5 ml de semen en el fondo de un tubo redondeado de 15 mm de diámetro y se añadieron 0,5 ml de medio MS-Dextrano (30 mg Dx/ml) muy lentamente sobre él evitando la mezcla de las fases. Sobre esta capa se depositaron 1,5 ml de MS-A (5 mg BSA/ml), medio que constituye la capa de recogida (la presencia de albúmina en este medio evita la aglutinación de los espermatozoides). Se incubó manteniendo el tubo en vertical durante 15 minutos a 37 °C para posteriormente extraer 750 µl de la capa superior que se sustituyeron por el mismo volumen de MS-A. Este proceso se realizó un total de cuatro veces, obteniendo cuatro sobrenadantes de los cuales el primero se desechó por contener trazas de plasma seminal. Los otros 3 se juntaron conformando la muestra C (control de *swim-up*).

Con el fin de evaluar el efecto del E<sub>2</sub> se realizaron otros dos procesos de *swim-up* simultáneamente a cuyas capas de recogida (medio MS-A) se añadieron distintas cantidades de E<sub>2</sub>, conformando las muestras B (de Baja E<sub>2</sub>, 100 pM) y A (de Alta concentración de E<sub>2</sub>, 1 µM). Las concentraciones de hormona añadidas se decidieron en base a las estimaciones de la concentración fisiológica de E<sub>2</sub> en el tracto reproductor femenino (Wang *et al.*, 2001). Como el estradiol estaba disuelto en DMSO, se añadió al medio MS-A de la muestra control (C) DMSO en la misma proporción que existía en las muestras con E<sub>2</sub> (1/10.000 (v/v)) para considerar los posibles efectos de este compuesto.

Estas 3 muestras obtenidas tras el proceso de *swim-up* (C, A y B) junto con la muestra de eyaculado (E) conforman los 4 grupos experimentales del primer objetivo de este trabajo. Sobre ellos se analizarán los siguientes parámetros:

- Concentración y porcentaje de recuperación celular
- Motilidad total y progresiva
- Integridad de membrana (viabilidad)
- Cambios relacionados con la apoptosis evaluados mediante el análisis de la inversión de fosfatidilserina en la membrana espermática
- Estado de capacitación mediante la tinción con clorotetraciclina (CTC) y análisis de fosforilación en los residuos de tirosina de las proteínas de membrana por Western Blot
- Estudio de la distribución del receptor de E<sub>2</sub>β en la superficie espermática mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI)

#### **4.2.2 Cálculo de la concentración y del porcentaje de recuperación espermática**

La muestra de eyaculado se diluyó 1:2000 (v/v) y las procedentes del *swim-up* 1:100; en ambos casos el diluyente fue el agua para inmovilizar los espermatozoides y facilitar el recuento. Se colocó una gota de 6 µl en la cámara de Neubauer y se realizó el recuento mediante un microscopio de contraste de fases (Nikon Eclipse 50i, Nikon, Tokyo, Japón) con un objetivo 10x. Este proceso se realizó por duplicado para cada muestra y se hizo una media entre los dos recuentos para minimizar los errores. La concentración se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$C = N^{\circ}\text{espermatozoides contados} \times 10^4 \text{ml} \times \frac{1}{\text{Dilución}} = \text{Espermatozoides/ml}$$

El porcentaje de recuperación celular por su parte corresponde a la siguiente fórmula:

$$\% \text{recuperación} = 100 \times \frac{\text{Concentración Swim} - \text{up} \times 3 \times 0,75 \text{ml}}{\text{Concentración del eyaculado} \times 0,5 \text{ml}}$$

#### 4.2.3 Evaluación de la motilidad espermática

La determinación de la motilidad espermática se realizó utilizando un sistema de análisis computerizado (CASA, *computer assisted semen analysis*), concretamente el ISAS 1.0.4 (Proiser SL, Valencia, España) que emplea una cámara de video (Basler A312F, Basler Vision, Exton, PA) montada sobre un microscopio de contraste de fases (Nikon Eclipse 50i, Nikon, Tokyo, Japón). La muestra de eyaculado se diluyó 1:100 y las muestras de *swim-up* 1:5 en medio bifase compuesto por sacarosa 0,25 M, EGTA 0,1 mM, fosfato sódico 4 mM y tampón HEPES 10x (Glucosa 50 mM, HEPES 100 mM, KOH 20 mM) 10% (v/v).

Se colocó una gota de 7 µl de la muestra a analizar entre un portaobjetos y un cubreobjetos (previamente atemperados a 37 °C) y usando un objetivo 10x se evaluaron 5 campos por cada gota, obteniendo los parámetros de motilidad total (% de espermatozoides móviles) y motilidad progresiva (% de espermatozoides que se mueven siguiendo una trayectoria recta).

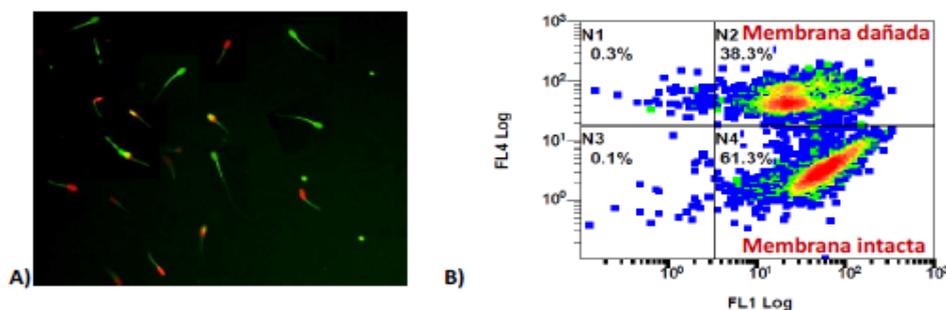
#### 4.2.4 Evaluación de la integridad de la membrana plasmática (Viabilidad)

La integridad de membrana se valoró mediante el método descrito por Harrison y Vickers (Harrison y Vickers, 1990) conocido como método del yoduro de propidio/diacetato de carboxifluoresceína (PI/CFDA). Esta técnica se basa en la diferente coloración de los espermatozoides tras su incubación con estos colorantes dependiendo de su viabilidad, entendiendo esta como integridad de membrana. El diacetato de carboxifluoresceína es incoloro y capaz de atravesar la membrana del espermatozoide, una vez en su interior las esterasas del espermatozoide lo transformaran en carboxifluoresceína adquiriendo un color verde. El yoduro de propidio por su parte, es un agente intercalante de color rojo e incapaz de penetrar la membrana del espermatozoide. En aquellas células que posean la membrana dañada el PI será capaz de llegar a su material genético y unirse a él adquiriendo la célula una tonalidad roja. Así pues los espermatozoides observados de color verde poseen una membrana intacta además de mantener la funcionalidad de sus enzimas internas por lo que serán considerados viables mientras que los teñidos de rojo, signo del deterioro de su membrana, serán considerados como no viables (Figura 4.2).

La muestra de eyaculado se diluyó 1:500 y las procedentes del *swim-up* 1:60 en medio bifase, alcanzándose en ambos casos una concentración de  $6 \times 10^6$  células/ml. Se añadieron 3 µl de formaldehído (5% v/v), 3 µl de CFDA (0,46 mg/ml en DMSO) y 3 µl de PI. La mezcla se incubó en oscuridad durante al menos 10 minutos.

Las muestras se evaluaron mediante citometría de flujo usando un citómetro Beckman Coulter FC 500 (Beckman Coulter INC, Pasadena, CA, EEUU) que usa un láser de argón a 488 nm. La

fluorescencia se detectó usando los filtros FL1-525  $\pm$  5 nm para CFDA y FL4-675  $\pm$  5 nm para PI.



**Figura 4.2:** A) Doble tinción de los espermatozoides ovinos con yoduro de propidio y carboxifluoresceína observado mediante microscopía de fluorescencia a través de los filtros B-2A (filtro de excitación 450-490 nm) y G-2A (filtro de excitación 510-560 nm) y 400x. B) Diagrama representativo de la integridad de membrana evaluada por citometría de flujo, utilizando los fotodetectores FL1 y FL4.

#### 4.2.5 Análisis de la translocación de fosfatidilserina en la membrana plasmática

La fosfatidilserina (FS) es un fosfolípido que normalmente se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática, pero en procesos apoptóticos se transloca a la cara externa permitiendo a la célula ser reconocida por los fagocitos y así ser eliminada. Esta inversión de FS se analizó mediante la tinción con FITC-Anexina V (Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU). La anexina (Anex) es una proteína que muestra una alta afinidad por la FS y para este trabajo se adquirió unida a FITC, un fluorocromo verde. Esta tinción se combinó con yoduro de propidio (PI) que permite diferenciar a las células que tienen la membrana dañada de las que conservan su integridad.

De esta manera podemos diferenciar cuatro poblaciones en las muestras analizadas: Anex+/PI+ (células con inversión de FS y membrana dañada), Anex+/PI- (membrana intacta pero con inversión de FS), Anex-/PI- (sin inversión de FS y membrana intacta) y Anex-/PI+ (sin inversión de FS pero membrana dañada).

Se tomaron 10  $\mu$ l de muestra diluida previamente en medio bifase (1:100 en el caso del eyaculado y 1:5 en el de las muestras procedentes del *swim-up*) y se diluyeron en 250  $\mu$ l de tampón proporcionado por la casa comercial (Binding Buffer Apoptosis Detection Kit, Life Technologies). Posteriormente se añadieron en oscuridad 1  $\mu$ l de FITC-Anexina y 3  $\mu$ l de PI; tras su incubación a 37  $^{\circ}$ C durante 10 minutos se añadieron 4  $\mu$ l de formaldehído, que actúa como agente fijador, y cuatro minutos después 100  $\mu$ l de tampón de unión a anexina.

#### 4.2.6 Evaluación del estado de capacitación

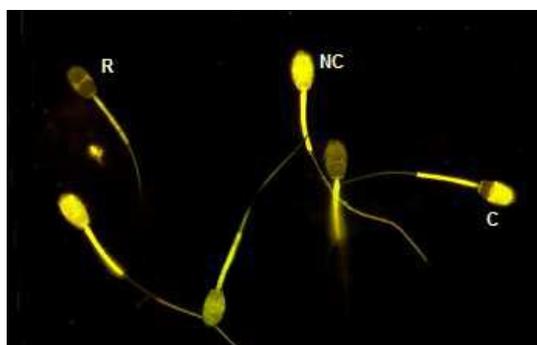
##### 4.2.6.1 Tinción con clorotetraciclina

La clorotetraciclina (CTC) es un antibiótico que al penetrar en la célula espermática se une al calcio libre y da lugar a patrones característicos de tinción en función de la distribución intracelular del mismo. Dependiendo de los diferentes estados fisiológicos del espermatozoide, existen diferentes patrones de fluorescencia que permiten hacer una diferenciación entre células no capacitadas (NC), capacitadas (C) y reaccionadas (R) (Gillan *et al.*, 1997). En este estudio se

utilizó una versión modificada del ensayo descrito por Ward y Storey (Ward y Storey, 1984) y validada para semen ovino por nuestro grupo de investigación (Grasa *et al.*, 2006).

Se mezclaron 20  $\mu$ l de la solución de clorotetraciclina (2 mg de CTC disueltos en 5 ml de un tampón compuesto por Tris 20 mM, cisteína 5  $\mu$ M y NaCl 130 mM, pH 7,8) con 20  $\mu$ l de las muestras seminales diluidas en medio bifase ( $3 \times 10^7$  células/ml) y 5  $\mu$ l de una solución de paraformaldehído (paraformaldehído al 1,2% (p/v) en tampón Tris-HCL 0,5 M, pH 7,4) como fijador. Esta mezcla se incubó una hora a 4 °C y en oscuridad. Tras ello, se prepararon las muestras depositando sobre un portaobjetos 3  $\mu$ l de trietilnediamino 0,22 M (DABCO) diluido en glicerol:PBS (9:1 v/v) y 6  $\mu$ l de cada muestra. La función del DABCO es la de preservar la fluorescencia. Se depositó un cubreobjetos sobre la muestra, se selló con esmalte de uñas y se mantuvo a 4 °C y en oscuridad hasta su análisis.

Este análisis se realizó mediante un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E-400) equipado con un filtro V-2A (filtro de 420-490 nm de excitación y 510 nm de emisión) y usando un objetivo de inmersión con aumento 100x. Se evaluaron 200 espermatozoides por muestra, distinguiéndose 3 tipos según el patrón de fluorescencia (Fig.4.3): NC-distribución uniforme de la fluorescencia en toda la cabeza, C-fluorescencia en la porción anterior de la cabeza y R-(sin fluorescencia en la cabeza).



**Figura 4.3:** Espermatozoides ovinos teñidos con CTC y visualizados con microscopía de fluorescencia bajo filtro V-2A y 100x. Se pueden distinguir espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (C) y reaccionados (R).

#### 4.2.6.2 Evaluación de la fosforilación en residuos de tirosinas mediante Western Blot

Otro de los fenómenos que acontecen durante la capacitación es el de la fosforilación en residuos de tirosinas. Este estudio se realizó sobre los grupos *Swim-up* Control (C),  $E_2$  100 pM (A) y  $E_2$  1  $\mu$ M (B).

##### Extracción de proteínas espermáticas

Se procedió a extraer las proteínas de membrana por el método descrito por Colás y colaboradores (Colás *et al.*, 2008). A 200  $\mu$ l de las muestras obtenidas del *swim-up* se les añadieron 100  $\mu$ l del 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 fosfatasa (Sigma Chemical Co., Madrid, España). La mezcla se incubó durante 5 minutos a 100 °C en baño de arena. Después, se centrifugó a 15000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se recogió el sobrenadante. Finalmente se añadieron 2-mercaptoetanol y glicerol a una

concentración final de 5% y 1% respectivamente. Estos extractos se conservaron a -20 °C hasta su análisis.

#### SDS-PAGE e Inmunoblotting

Las proteínas se separaron en una dimensión siguiendo el método Laemli (Laemmli, 1970) utilizando patrones de comparación de pesos moleculares, de 10 a 250 kDa (Sigmamarker, Sigma). Se utilizaron geles de acrilamida del 10% y las condiciones de electroforesis fueron 130 V durante 90 minutos, a 4 °C. Una vez separadas las proteínas se transfirieron a una membrana de Immobilon-P (Milipore, Temecula, CA, USA), utilizando una unidad de transferencia en húmedo, modelo Mini-Protean 3 Cell y el módulo Mini Trans-BlotR de Biorad.

Tras la transferencia de proteínas, los sitios no específicos de las membranas se bloquearon incubando una hora con PBST ( NaCl 3,13 g/l, KCl 0,2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g/l, y Tween-20 0,5%, pH 7,4) con 5% de BSA (v/v) a temperatura ambiente.

La detección de la fosforilación de tirosinas de proteínas de membrana se realizó a través de la incubación de las membranas durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario monoclonal anti-fosfotirosinas (Clone4G10R, Milipore, Temecula, CA, EEUU), diluido 1/1000 en 0,1 PBST con 1% BSA. Tras realizar tres lavados de 10 minutos de duración con 0,1% PBST, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario (IRDyeR 800CW Donkey anti-Mouse) diluido 1:15000, durante 1 hora y 15 minutos en semioscuridad. Finalmente, las membranas se escanearon usando el Odyssey Clx (Li-cor Biosciences). Además las membranas se tiñeron con Azul de Coomasie durante 30 minutos y se destiñeron con 30% de metanol y 10% de ácido acético durante toda la noche, para poder verificar que la transferencia se había producido correctamente. Se cuantificó la señal para determinar la intensidad relativa de las bandas de fosfotirosinas de las proteínas con el programa Quantity One software ( Bio Rad, Hercules, CA, EEUU).

#### **4.2.7 Determinación de la distribución del receptor E<sub>2</sub>β por inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

Se decidió estudiar la localización del receptor E<sub>2</sub>β en los espermatozoides de los distintos grupos experimentales para analizar posibles cambios en su distribución en respuesta a la inclusión de distintas concentraciones de E<sub>2</sub> en la capa de recogida del *swim-up*.

Para la IFI se partió de una concentración de 4 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml diluidos en tampón PBS ( NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM, pH 7,4), y se añadieron 50 µl de formaldehído 3,7% (v/v) para que actuara como fijador. Esta mezcla se incubó durante 20 minutos en rueda a temperatura ambiente. Tras la incubación, las muestras se centrifugaron durante 6 minutos a 900 g y, tras retirar el sobrenadante se resuspendieron en 500 µl de PBS. Se depositaron 4 µl de cada suspensión en portaobjetos polilisinados (Superfrost Plus, ThermoScientific) y se dejó secar la gota a temperatura ambiente para garantizar una correcta adhesión de las células. Tras esto, los portaobjetos se lavaron 3 veces con PBS en agitación durante 5 minutos.

Tras estos lavados se realizó el bloqueo de los sitios de unión inespecíficos con BSA al 5% en PBS durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se volvieron a realizar 3 lavados y se adicionó el anticuerpo primario (anticuerpo IgG policlonal de conejo antiE<sub>2</sub>β, Santa

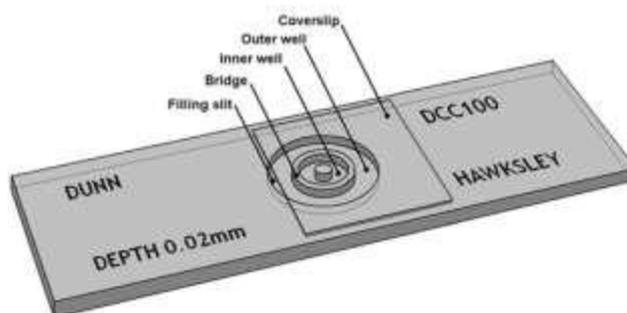
Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EEUU) diluido 1:25 en PBS con BSA al 1% (v/v) y se dejó incubando de nuevo toda la noche.

Tras esta incubación se realizaron de nuevo 3 lavados en idénticas condiciones a los anteriores y se añadió el anticuerpo secundario unido a un fluorocromo (Alexa Fluor 488 anti-conejo generado en pollo, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU). Esta vez la incubación fue de 1 hora y en oscuridad. Tras otros 3 lavados se montaron los portaobjetos con DABCO 0,22 M en solución de glicerol:PBS 9:1, para atenuar la pérdida de fluorescencia.

Las muestras se observaron mediante microscopía de fluorescencia (Nikon Eclipse E-400 con iluminación de epifluorescencia y un filtro V-2) con un objetivo de inmersión 100x. Se contaron 150 células por muestra, clasificando a los espermatozoides en distintos subtipos en función del marcaje.

### **4.3 Influencia del estradiol sobre la orientación espermática**

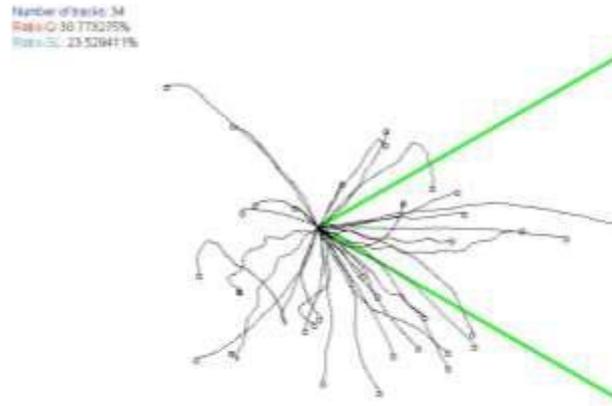
La capacidad quimiotáctica de los espermatozoides se analizó por un sistema de análisis computerizado desarrollado recientemente por nuestro grupo de investigación tomando como base el software libre ImageJ (ImageJ Casa Biozar) y utilizando un microscopio de contraste de fases (Nikon Eclipse 50i, Nikon, Tokyo, Japón) al que se le conectó una cámara de video (acA1920-155uc, Basler, Exton, PA).



**Figura 4.4:** Esquema de la cámara Dunn

El estudio se realizó utilizando una cámara Dunn (Figura 4.4), la cual puede ser definida como un portaobjetos de cristal con dos pocillos concéntricos de 0,02 mm de profundidad separados por un puente de 1 mm de ancho. La muestra espermática a analizar se coloca en el pocillo interno y la solución potencialmente quimioatrayente en el pocillo externo, creando un gradiente de concentración radial. Se evalúa el porcentaje de espermatozoides que son capaces de salir del pocillo central y dirigirse hacia la zona exterior tomando imágenes en la zona del puente.

El software ImageJ Casa Biozar detecta las coordenadas de la trayectoria de los espermatozoides y calcula y dibuja estas trayectorias normalizándolas a un mismo punto de referencia. Seleccionaremos la región del plano donde existe el gradiente de hormona (cono quimiotáctico) y a partir de aquí el programa calculará 2 parámetros distintos, el índice Q (porcentaje de espermatozoides cuya dirección instantánea en cada *frame* entra dentro del cono quimiotáctico) y el índice SL (porcentaje de espermatozoides cuya trayectoria entra dentro del cono quimiotáctico en base únicamente a su posición inicial y final), que permiten evaluar la existencia de quimiotaxis.



**Figura 4.5:** Análisis gráfico de la quimiotaxis obtenido mediante el software ImageJ Casa Biozar mostrando: cono quimiotáctico (verde), trayectorias de los espermatozoides (centro) y los índices quimiotácticos y el número de espermatozoides detectados (zona superior izquierda)

La quimiotaxis se ha descrito en otras especies únicamente en espermatozoides capacitados (Bahat y Eisenbach, 2006). Por ello, se evaluó la quimiotaxis tanto de los espermatozoides procedentes del *swim-up* control, como de espermatozoides capacitados *in vitro*.

La capacitación se realizó sobre alícuotas de  $1,6 \times 10^6$  células/ml en una estufa a  $39^\circ\text{C}$ , con 5% de  $\text{CO}_2$  y 100% de humedad. Se utilizó el medio TALP completo para inducir la capacitación (NaCl 100 mM, KCl 3,1 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,3 mM, lactato sódico 21,6 mM,  $\text{CaCl}_2$  3 mM,  $\text{MgCl}_2$  0,4 mM, HEPES 10 mM, piruvato sódico 1 mM, glucosa 5 mM, BSA 5 mg/ml, pH 7,2) al cual se añadió una mezcla de sustancias (db-cAMPc 1 mM, cafeína 1 mM, teofilina 1 mM, ácido okadoico 0,2  $\mu\text{M}$ , metil- $\beta$ -ciclodextrinas 2,5 mM) con capacidad de inducir la capacitación *in vitro* de los espermatozoides ovinos (Colás *et al.*, 2008).

En el pocillo exterior se colocaron 90  $\mu\text{l}$  de medio MS-A con la sustancia quimioatrayente en una concentración igual a la utilizada en el ensayo anterior (100 pM y 1  $\mu\text{M}$ ) o con 1/10000 (v/v) de DMSO como control, mientras que en el pocillo interior se colocaron 30  $\mu\text{l}$  de la muestra espermática diluida 1:10. Se cubrió con un cubreobjetos y se grabó un video durante 3 segundos que posteriormente se analizó mediante el programa anteriormente mencionado.

#### **4.4 Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software Gradpad InStat (5.01, San Diego, CA, EEUU). Los resultados se muestran como la media  $\pm$  S.E.M. (error estándar de la media). Se realizó el análisis  $\chi^2$  comparando todas las muestras para detectar diferencias significativas en el porcentaje de recuperación, la motilidad, la viabilidad, el estado de capacitación y translocación de fosfatidilserina, en la inmunolocalización del receptor de  $\text{E}_2$  y en el análisis de quimiotaxis. Para la cuantificación de fosfotirosinas se realizó un análisis de varianza (One-Way ANOVA).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Efecto de la presencia de estradiol en el medio de recogida de *swim-up*

En esta primera parte del trabajo se analizó el efecto de la adición de E<sub>2</sub> en el medio de recogida de *swim-up* (MS-A) sobre los espermatozoides, comparándolo con las muestras de eyaculado y de *swim-up* control (sin hormona).

Los cuatro grupos experimentales por tanto son: E: Eyaculado; C: Swim-up Control (con 1/10000 (v/v) DMSO en el medio de recogida); B: Baja concentración de estradiol (E<sub>2</sub> 100 pM en el medio de recogida); A: Alta concentración de estradiol (E<sub>2</sub> 1 μM en el medio de recogida).

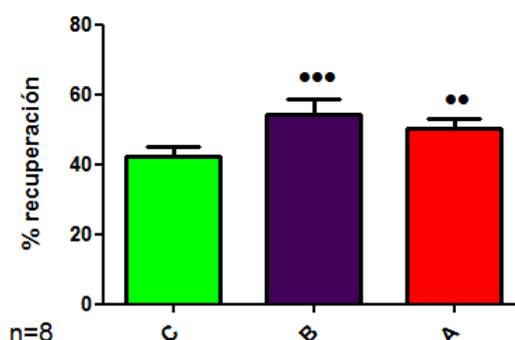
#### 5.1.1 Concentración y porcentaje de recuperación

La adición de E<sub>2</sub> en la capa de recogida del *swim-up* produjo un incremento de la concentración de espermatozoides con respecto al *swim-up* control, si bien este aumento no fue significativo (Tabla 5.1).

**Tabla 5.1:** Concentración de espermatozoides en las muestras de eyaculado, *swim-up* control y con 100 pM y 1 μM de E<sub>2</sub> en la capa de recogida. Los resultados se muestran como media ± SEM de 8 experimentos.

Concentración (10 <sup>8</sup> espermatozoides/ml)			
Eyaculado	Control	E <sub>2</sub> 100 pM	E <sub>2</sub> 1 μM
33,5 ± 2,2	3,6 ± 0,1	4,4 ± 0,3	4,4 ± 0,2

Sin embargo, el análisis del porcentaje de recuperación celular con respecto al eyaculado sí reflejó un incremento significativo en las muestras con hormona frente al control de *swim-up* (P<0,001 y P<0,01 para muestras de *swim-up* con baja y alta concentración de E<sub>2</sub> respectivamente ; n=8) (Figura 5.1).



**Figura 5.1:** Porcentaje de espermatozoides recuperados tras el *swim-up* en las muestras control (C) y con 100 pM (B) y 1 μM (A) de E<sub>2</sub> en la capa de recogida. Los resultados se muestran como media ± SEM de 8 experimentos. \*\*\* P<0,001; \*\*P<0,01 respecto de la muestra control del *swim-up* (C).

Este incremento de espermatozoides recuperados tras el *swim-up* podría explicarse por un posible efecto quimioatrayente que el estradiol ejercería sobre los espermatozoides ovinos atrayéndolos hacia la capa superior. Sin embargo, resulta llamativo el hecho de que sean atraídos en mayor medida por una concentración menor de hormona, hecho que se tratará de explicar posteriormente.

### 5.1.2 Evaluación de la motilidad espermática

No se obtuvieron diferencias significativas en la motilidad total ni en la motilidad progresiva entre los distintos *swim-up* entre sí, ni tampoco comparando con la muestra de eyaculado (Tabla 5.2).

**Tabla 5.2:** Porcentaje de espermatozoides móviles y móviles progresivos en las muestras de eyaculado, *swim-up* control y con 100 pM y 1  $\mu$ M de E<sub>2</sub> en la capa de recogida. Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM de 12 experimentos.

<b>Motilidad (espermatozoides móviles)</b>				
	<b>Eyaculado</b>	<b>Control</b>	<b>E<sub>2</sub> 100pM</b>	<b>E<sub>2</sub> 1<math>\mu</math>M</b>
<b>Móviles totales</b>	81,3 $\pm$ 2,3	80,8 $\pm$ 3,7	86,6 $\pm$ 2,3	82,1 $\pm$ 3,3
<b>Móviles progresivos</b>	39,4 $\pm$ 2,8	34,8 $\pm$ 1,0	34,4 $\pm$ 2,3	36,1 $\pm$ 2,5

El hecho de que la motilidad no mejore en ninguno de los grupos con respecto al semen recién eyaculado, podría ser explicarse en base a la buena calidad seminal de la muestra de la que se parte, puesto que los análisis se realizaron en la época reproductiva de la especie ovina (septiembre-marzo). Estudios previos en esta especie han demostrado que el porcentaje de mejora de la motilidad tras un proceso de *swim-up* depende de la motilidad de la muestra inicial, siendo mejor cuando peor es esta (García-López *et al.*, 1996) por lo que en muestras de alta motilidad como las utilizadas en estos experimentos, la diferencia puede no ser significativa.

El hecho de que la adición de estradiol no ejerza ninguna influencia sobre la motilidad espermática corrobora los resultados obtenidos por algunos autores (Hunter, 1988) (Wang *et al.*, 2001).

### 5.1.3 Análisis de la integridad de la membrana plasmática (Viabilidad)

Como se observa en la tabla 5.3, no se encontraron diferencias significativas en la viabilidad espermática entre ninguno de los grupos experimentales. Al igual que en el caso de la motilidad, la buena calidad seminal propia de la estación explicaría que tras realizar los distintos *swim-up* la viabilidad apenas se vea modificada.

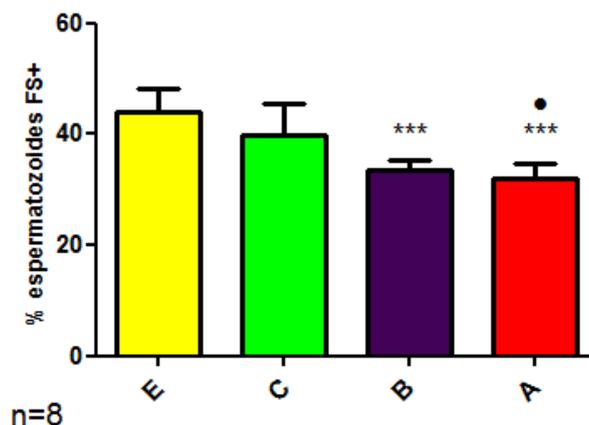
**Tabla 5.3:** Porcentaje de espermatozoides viables en las muestras de eyaculado, *swim-up* control y con 100 pM y 1  $\mu$ M de E<sub>2</sub> en la capa de recogida. Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM de 9 experimentos.

<b>Viabilidad (% espermatozoides viables)</b>			
<b>Eyaculado</b>	<b>Control</b>	<b>E<sub>2</sub> 100pM</b>	<b>E<sub>2</sub> 1<math>\mu</math>M</b>
75,6 $\pm$ 2,0	73,1 $\pm$ 2,1	74,1 $\pm$ 2,7	73,6 $\pm$ 2,1

### 5.1.4 Análisis de la translocación de fosfatidilserina (FS) en la membrana plasmática

Dada la nula variación en la viabilidad observada en el apartado anterior se decidió enfocar el análisis de este parámetro únicamente sobre la translocación de FS, esto es unificando las poblaciones Anex+/PI+ (células con inversión de FS y membrana dañada) y Anex+/PI- (membrana intacta pero con inversión de FS) evaluando de esta manera únicamente la manifestación de este rasgo apoptótico (FS+).

Como podemos observar en la figura 5.2, existe un descenso en el número de espermatozoides con inversión de FS en todos los grupos con respecto al semen inicial. Lo interesante es que este descenso no es significativo en el caso del *swim-up* control, pero sí en las muestras a las que se les añadió estradiol ( $P < 0,001$ ). Además, la muestra con alta concentración de hormona (A) presentó un menor porcentaje de espermatozoides FS+ que el *swim-up* control ( $32,1 \pm 2,6\%$  vs.  $40 \pm 5,8\%$ ;  $P < 0,05$ ). Este hecho apunta a que la presencia de esta hormona previene contra la translocación de FS, corroborando ciertos resultados anteriores (Aquila *et al.*, 2004). Este efecto podría atribuirse a una protección por parte del estradiol sobre los espermatozoides ovinos frente al fenómeno de la apoptosis o a la capacidad de esta hormona de prevenir la capacitación espermática hecho que también había sido postulado con anterioridad (Sebkova *et al.*, 2012).

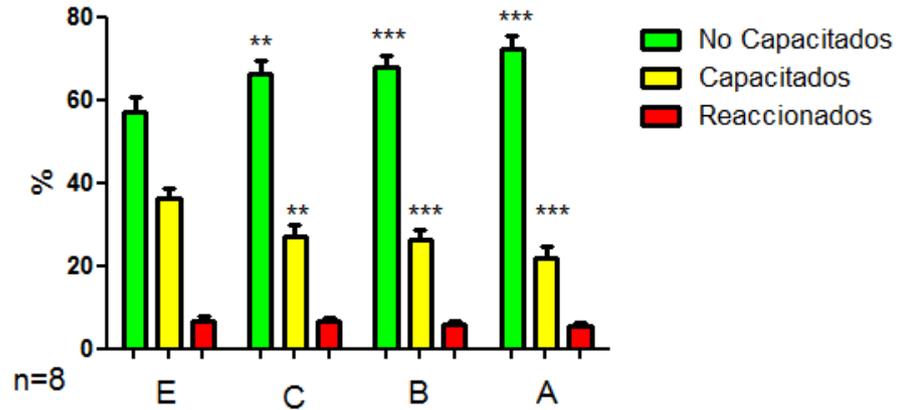


**Figura 5.2:** Porcentaje de espermatozoides con translocación de fosfatidilserina en las muestras de eyaculado (E), *swim-up* control (C) y con 100 pM (B) y 1  $\mu$ M (A) de  $E_2$  en la capa de recogida. Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM de 8 experimentos. \*\*\*  $P < 0,001$  respecto del eyaculado; •  $P < 0,05$  respecto de la muestra control del *swim-up* (C).

## 5.1.5 Evaluación del estado de capacitación

### 5.1.5.1 Tinción con clorotetraciclina

Como se puede observar en la figura 5.3 se encontraron diferencias significativas en el estado de capacitación al comparar las muestras procedentes de *swim-up* frente al eyaculado. En general, el proceso de *swim-up* permite aumentar el porcentaje de espermatozoides no capacitados recuperados, siendo este incremento muy significativo en el caso del control ( $P < 0,01$ ) y altamente significativo en el caso de las muestras con hormona ( $P < 0,001$ ). En el caso del *swim-up* llevado a cabo en presencia de alta concentración de estradiol, en la capa de recogida se obtuvo un  $72,3 \pm 3,2\%$  de espermatozoides no capacitados frente a un  $57 \pm 3,5\%$  presente en el eyaculado. Este aumento, en todas las muestras de *swim-up* fue concomitante con un descenso en el número de espermatozoides capacitados.



**Figura 5.3:** Porcentaje de espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados en las muestras de eyaculado (E), *swim-up* control (C) y con 100 pM (B) y 1  $\mu$ M (A) de E<sub>2</sub> en la capa de recogida. Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM de 8 experimentos. \*\*\*P<0,001; \*\*P<0,01 respecto del eyaculado.

Si se compara entre los distintos *swim-up*, existe un mayor porcentaje de espermatozoides no capacitados en la muestra con alta concentración de hormona en comparación con el control ( $72,3 \pm 3,2\%$  vs.  $66,3 \pm 3,1\%$ ), aunque esta diferencia no es significativa. Este incremento en el número de espermatozoides no capacitados recuperados estaría en concordancia con los estudios que postulaban al estradiol como un inhibidor de la capacitación (Sebkova *et al.*, 2012). En este caso la acción sería directamente proporcional a la concentración de estradiol e independiente de la acción de la progesterona al no encontrarse ésta en nuestro medio de recogida.

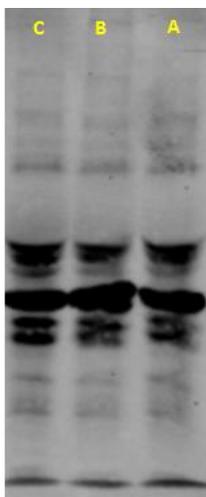
Otra posible explicación a este hecho podría ser que el estradiol ejerciera un efecto quimioatractivo sobre la población de espermatozoides no capacitados, y que por ello el medio de recogida se viera enriquecido en ellos. Esta posibilidad quedaría descartada ya que en la mayoría de las especies la adquisición del movimiento de hiperactivación ligado a la capacitación es una condición indispensable para la orientación quimiotáctica de los espermatozoides (Perez-Cerezales *et al.*, 2015). En este TFG se llevaron a cabo experimentos de quimiotaxis en presencia de estradiol con espermatozoides frescos y capacitados para tratar de arrojar luz sobre esta hipótesis.

En cuanto a la reacción acrosómica, no se detectaron variaciones significativas en el porcentaje de espermatozoides reaccionados en los *swim-up* llevados a cabo en presencia de estradiol, por lo que parece que esta hormona no ejerce ningún efecto sobre la reacción acrosómica. Sin embargo no debemos olvidar que la capacitación es un proceso secuencial cuyo punto final es la reacción acrosómica, y el hecho de no observar cambios a este nivel puede ser debido simplemente al corto periodo de tiempo de incubación con la hormona, ya que el proceso de *swim-up* dura sólo una hora.

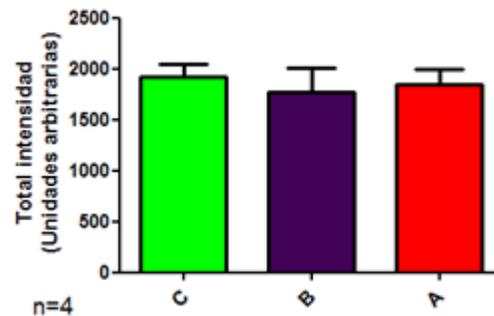
### 5.1.5.2 Evaluación de la fosforilación en residuos de tirosinas

Como se aprecia en la figura 5.4, en la que podemos observar una membrana representativa de los distintos análisis de fosforilación en residuos de tirosinas de las proteínas espermáticas, no se observaron diferencias entre las muestras obtenidas en presencia de estradiol y el *swim-up* control. La figura 5.5 representa los resultados de la cuantificación densitométrica del total de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina, donde podemos ver que no existen diferencias significativas.

La fosforilación en residuos de tirosina de las proteínas de membrana plasmática es un evento asociado a la capacitación espermática (Grasa *et al.*, 2006). En el estudio del estado de capacitación por medio de la tinción con clorotetraciclina observamos un descenso en el número de espermatozoides capacitados que, sin embargo no se ha visto reflejado en un descenso significativo en la fosforilación en residuos de tirosinas. Esto se podría explicar dado que la capacitación es un proceso secuencial que implica varias rutas de señalización, pudiendo un compuesto tener efecto sobre una de las manifestaciones del proceso, como el cambio en la distribución intracelular del calcio (evidenciado por la tinción con clorotetraciclina) pero no sobre otros procesos anteriores como la fosforilación en residuos de tirosinas.



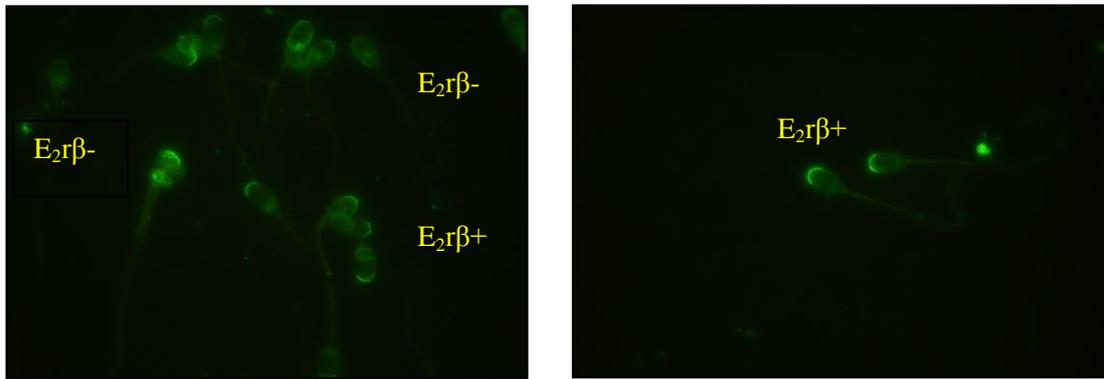
**Figura 5.4:** Western blot representativo de los obtenidos con anticuerpos anti-fosfotirosina de proteínas extraídas de los espermatozoides de las muestras de *swim-up* control (C), E<sub>2</sub> 100 pM (B), y E<sub>2</sub> 1 μM (A).



**Figura 5.5:** Cuantificación por densitometría del total de proteínas fosforiladas en tirosinas de las muestras *swim-up* control (C) y con 100 pM (B) y 1 μM (A) de E<sub>2</sub> en la capa de recogida. Los resultados se muestran como media ± SEM de 4 experimentos.

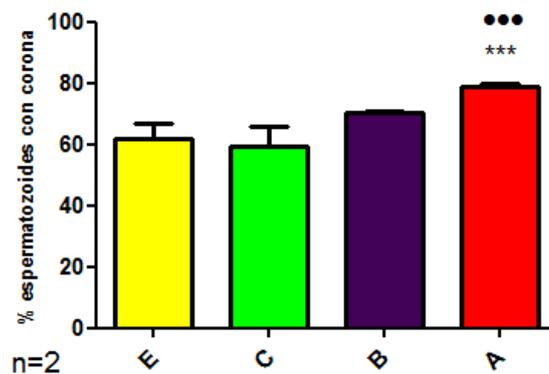
### 5.1.6 Determinación de la distribución del receptor E<sub>2</sub>β por inmunofluorescencia indirecta

El objetivo de este estudio fue determinar si la presencia de estradiol en la capa de recogida del *swim-up* daba lugar a cambios en la exposición y/o distribución del receptor de estradiol β (E<sub>2</sub>β), sobre la superficie espermática. A pesar de que el número de ensayos de inmunofluorescencia indirecta fue de 7, solo se pudieron obtener resultados concluyentes de dos de ellos debido a la presencia de una señal de inmunofluorescencia difusa en muchos de ellos que dificultaba la diferenciación de subtipos. Aun así se pudieron observar dos subtipos celulares, con marcaje en la zona apical de la cabeza (similar a una corona o diadema) (E<sub>2</sub>rβ+), o sin él (E<sub>2</sub>rβ-), que coinciden con lo descrito con anterioridad por nuestro grupo (Casao *et al.*, 2011).



**Figura 5.6:** Imágenes obtenidas mediante inmunofluorescencia indirecta y evaluadas por microscopia de fluorescencia de la distribución del receptor  $E_2\beta$  en la membrana.

Debido a la escasez de datos, los resultados aquí presentados son totalmente preliminares y evidentemente el análisis estadístico no goza de ninguna validez experimental. Sin embargo merece la pena al menos comentar el aumento del número de espermatozoides que exhiben el receptor de estradiol en la parte apical de la cabeza en aquellas muestras de *swim-up* llevado a cabo en presencia de la hormona siendo significativo cuando este se encuentra a una concentración 1  $\mu\text{M}$ . En estudios anteriores, nuestro grupo había descrito una correlación significativa entre la pérdida de marcaje (relacionado con la presencia del receptor de estradiol) y la capacitación. Por tanto, los resultados aquí presentados, que describen un mayor porcentaje de espermatozoides con marcaje en las muestras seleccionadas en presencia de hormona, apuntarían a una mayor proporción de espermatozoides no capacitados, lo que corrobora el resto de los resultados de este TFG que apuntan hacia una acción inhibitoria del proceso de capacitación por parte del estradiol.



**Figura 5.7:** Porcentaje de espermatozoides que presentan el patrón de marcaje de corona apical para el receptor  $E_2\beta$ , evaluado mediante IFI, en las muestras de eyaculado (E), *swim-up* control (C) y con 100 pM (B) y 1  $\mu\text{M}$  (A) de  $E_2$  en la capa de recogida. Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM de 2 experimentos. \*\*\*  $P < 0,001$  respecto del eyaculado; ●●●  $P < 0,001$  respecto del *swim-up* control.

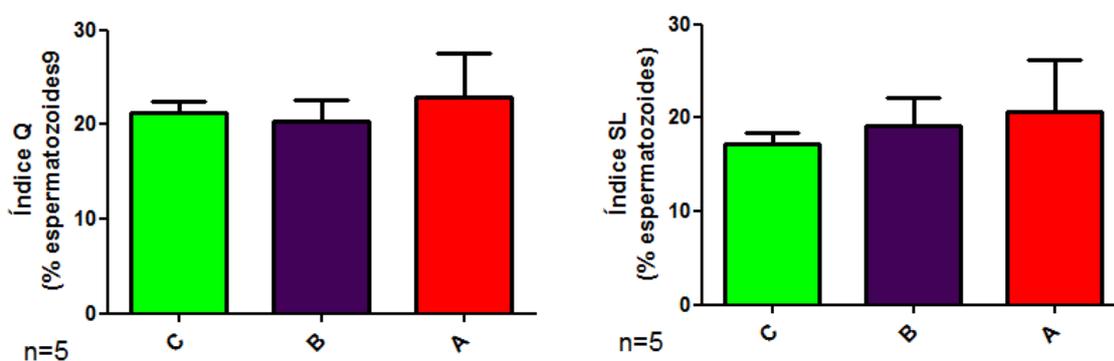
Como resumen de la influencia del estradiol en el medio del *swim-up* sobre los espermatozoides podríamos decir que su presencia da lugar a un incremento del porcentaje de recuperación

celular, y una disminución en el porcentaje de espermatozoides capacitados y con exposición de fosfatidilserina, lo que indica que podría tener un cierto papel como inhibidor o retardante de la capacitación.

## **5.2 Influencia del estradiol sobre la orientación espermática**

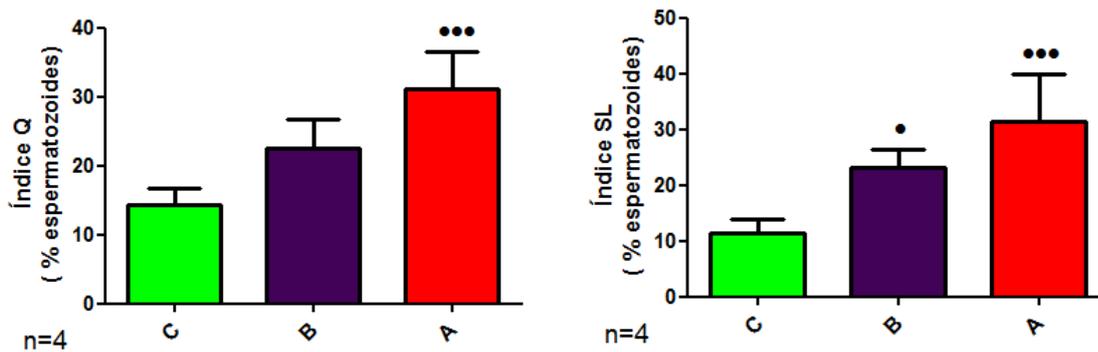
Se decidió evaluar la influencia del estradiol sobre la direccionalidad espermática dada su presencia en el tracto reproductor femenino y la posible relación de este mecanismo con cambios en la distribución del calcio evidenciadas por la tinción con clorotetraciclina (CTC). Para llevar a cabo este objetivo se utilizó una cámara específicamente diseñada para este análisis y un software desarrollado por nuestro grupo de investigación.

En primer lugar, se evaluó la quimiotaxis en espermatozoides seleccionados y libres de plasma seminal obtenidos mediante la técnica de *swim-up* anteriormente explicada. Como se aprecia en la figura 5.8 no se observaron cambios estadísticamente significativos para ninguno de los dos índices analizados en las muestras sometidas a un gradiente de estradiol respecto de la muestra control rodeada de un medio sin hormona. Este resultado no resulta sorprendente ya que como se observa en la figura 5.3 la muestra de *swim-up* control presenta una gran mayoría de espermatozoides no capacitados los cuales, en las pocas especies estudiadas, no parecen responder a los fenómenos de atracción quimiotáctica (Perez-Cerezales *et al.*, 2015).



**Figura 5.8:** Análisis de los índices quimiotácticos Q (Izquierda) y SL (Derecha) en espermatozoides procedentes de *swim-up*, usando una cámara Dunn en presencia de un medio sin E<sub>2</sub> (C), o un gradiente de E<sub>2</sub> formado a partir de una concentración 100 pM (B) o 1 μM (A). Los resultados se muestran como media ± SEM de 5 experimentos.

Posteriormente se llevaron a cabo los mismos estudios con muestras de espermatozoides previamente capacitados *in vitro*, observándose esta vez un aumento significativo en los dos índices analizados cuando el medio que rodea a la muestra contiene estradiol. Este aumento fue altamente significativo para los dos índices estudiados (P<0,001) cuando el estradiol se encontraba en una concentración 1 μM, mientras que con una concentración 100 pM solo fue significativo (P<0,05) para el índice SL (Figura 5.9). Este hecho podría explicarse en base a que ambos índices predicen la atracción quimiotáctica teniendo en cuenta parámetros distintos. Cabe destacar que todavía no se conoce cuál de ellos es más preciso dado el reciente desarrollo del programa y la todavía falta de validación del mismo mediante un mayor número de experimentos.



**Figura 5.9:** Análisis de los índices quimiotácticos Q (Izquierda) y SL (Derecha) en espermatozoides capacitados *in vitro*, usando una cámara Dunn en presencia de un medio sin E<sub>2</sub> (C), o un gradiente de E<sub>2</sub> formado a partir de una concentración 100 pM (B) o 1 μM (A). Los resultados se muestran como media ± SEM de 4 experimentos. ••• P<0,001; •P<0,05 respecto del *swim-up* control (C).

A la vista de estos resultados, parece evidente la existencia de una actividad quimioatrayente del estradiol sobre los espermatozoides capacitados dependiente de la concentración, siendo posiblemente capaz de guiarlos en su ruta por el tracto reproductor femenino. Cabe destacar que este hecho no se había descrito hasta ahora.

Esta atracción podría explicar el aumento del % de recuperación en los *swim-up* realizados en presencia de esta hormona con respecto al control (Figura 5.1). Además, también se explicaría el mayor porcentaje de recuperación observado en presencia de 100 pM de estradiol respecto a 1 μM, que se debería a la mayor proporción de espermatozoides capacitados en esta muestra (Figura 5.3) y, por tanto, sensibles a la atracción quimiotáctica.

Integrando las distintas evidencias obtenidas en este trabajo, podríamos formular una posible teoría sobre la acción del estradiol en el tracto reproductor femenino. El estradiol puede actuar como un agente protector del espermatozoide tras su eyaculación, impidiendo una capacitación prematura, para convertirse en una sustancia quimioatrayente una vez que el espermatozoide ha alcanzado el estado de capacitación, guiándolo hasta el ovocito a lo largo de su recorrido por el tracto reproductor femenino.

## **6. CONCLUSIONES**

Las conclusiones que se extraen de este trabajo en base a los resultados obtenidos se enumeran a continuación:

- La presencia de estradiol a concentración 100 pM y 1  $\mu$ M en el medio de recogida del método de selección espermática *swim-up/dextrano* aumenta de forma significativa el porcentaje de recuperación de espermatozoides ovinos, el porcentaje de espermatozoides no capacitados y disminuye la exposición de fosfatidilserina en la superficie externa de su membrana.
- La presencia de 1  $\mu$ M de estradiol en el medio de recogida del método de selección espermática *swim-up/dextrano* aumenta el número de espermatozoides que presentan el receptor E<sub>2</sub> $\beta$  en su región apical.
- La presencia de estradiol a concentración 100 pM y 1  $\mu$ M en el medio de recogida del método de selección espermática *swim-up/dextrano* no tiene efecto significativo sobre la motilidad, integridad de membrana o fosforilación de proteínas espermáticas en residuos de tirosina.
- El estradiol tanto a dosis bajas (100 pM) como altas (1  $\mu$ M) es capaz de activar mecanismos de quimiotaxis en espermatozoides ovinos capacitados *in vitro*.

## **CONCLUSIONS**

The conclusions that can be drawn from this project are listed below:

- The presence of estradiol at concentration 100 pM and 1  $\mu$ M in the upper layer of the dextran/*swim-up* sperm selection method results in a significant increase in ram sperm recovery rate and the percentage of non-capacitated spermatozoa, and a decrease in the phosphatidylserine exposition in their external membrane.
- The presence of 1  $\mu$ M estradiol in the upper layer of the dextran/*swim-up* sperm selection method results in an increase in the number of ram spermatozoa showing the E<sub>2</sub>B receptor at their apical region.
- The presence of 100 pM and 1  $\mu$ M estradiol in the upper layer of the dextran/*swim-up sperm* selection method does not cause any changes in the percentage of motile ram sperm, their membrane integrity or phosphorylation of their protein tyrosine residues.
- Estradiol at both (100 pM and 1  $\mu$ M) concentrations can activate chemotaxis in ram spermatozoa capacitated *in vitro*.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

- Adeoya-Osiguwa SA, Markoulaki S, Pocock V, Milligan SR, Fraser LR. 2003. 17beta-Estradiol and Environmental Estrogens Significantly Affect Mammalian Sperm Function. *Hum Reprod* 18: 100-107.
- Aquila S, Sisci D, Gentile M, Middea E, Catalano S, Carpino A, Rago V, Ando S. 2004. Estrogen Receptor (Er)Alpha and Er Beta Are Both Expressed in Human Ejaculated Spermatozoa: Evidence of Their Direct Interaction with Phosphatidylinositol-3-Oh Kinase/Akt Pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 1443-1451.
- Arkoun B, Gautier C, Delalande C, Barrier-Battut I, Guenon I, Goux D, Bouraima-Lelong H. 2014. Stallion Spermatozoa: Putative Target of Estrogens; Presence of the Estrogen Receptors Esr1, Esr2 and Identification of the Estrogen-Membrane Receptor Gper. *Gen Comp Endocrinol* 200: 35-43.
- Armon L, Eisenbach M. 2011. Behavioral Mechanism During Human Sperm Chemotaxis: Involvement of Hyperactivation. *PLoS One* 6: 7.
- Bahat A, Eisenbach M. 2006. Sperm Thermotaxis. *Mol Cell Endocrinol* 252: 115-119.
- Baldi E, Luconi M, Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Forti G. 2009. Nongenomic Activation of Spermatozoa by Steroid Hormones: Facts and Fictions. *Mol Cell Endocrinol* 308: 39-46.
- Bishop CV, Stormshak F. 2008. Non-Genomic Actions of Progesterone and Estrogens in Regulating Reproductive Events in Domestic Animals. *Vet J* 176: 270-280.
- Casao A, Gallego M, Pérez-Pe R, Muiño-Blanco T, Cebrian-Pérez J. 2011. Immunolocalization of Estrogen Receptor Beta in Ejaculated Ram Spermatozoa. *Reprod. Dom. An.* 46: 93-93.
- Cifti H, Zulkadir U. 2010. The Effect of Oestradiol-17 Beta on the Motility, Viability and the Acrosomal Status of Bull Sperm. *South African Journal of Animal Science* 40: 6-13.
- Colás C, James P, Howes L, Jones R, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T. 2008. Cyclic-Amp Initiates Protein Tyrosine Phosphorylation Independent of Cholesterol Efflux During Ram Sperm Capacitation. *Reprod Fertil Dev* 20: 649-658.
- Ded L, Dostalova P, Dorosh A, Dvorakova-Hortova K, Peknicova J. 2010. Effect of Estrogens on Boar Sperm Capacitation in Vitro. *Reprod Biol Endocrinol* 8: 1477-7827.
- Ded L, Sebkova N, Cerna M, Elzeinova F, Dostalova P, Peknicova J, Dvorakova-Hortova K. 2013. In Vivo Exposure to 17beta-Estradiol Triggers Premature Sperm Capacitation in Cauda Epididymis. *Reproduction* 145: 255-263.
- Fujinoki M. 2010. Suppression of Progesterone-Enhanced Hyperactivation in Hamster Spermatozoa by Estrogen. *Reproduction* 140: 453-464.
- Fujinoki M, Takei GL, Kon H. 2016. Non-Genomic Regulation and Disruption of Spermatozoal in Vitro Hyperactivation by Oviductal Hormones. *J Physiol Sci* 66: 207-212.
- Gadella BM, Harrison RA. 2002. Capacitation Induces Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate-Dependent, but Apoptosis-Unrelated, Exposure of Aminophospholipids at the Apical Head Plasma Membrane of Boar Sperm Cells. *Biol Reprod* 67: 340-350.
- Garcia-Alvarez O, Maroto-Morales A, Jimenez-Rabadan P, Ramon M, del Olmo E, Iniesta-Cuerda M, Anel-Lopez L, Fernandez-Santos MR, Garde JJ, Soler AJ. 2015. Effect of Different Media Additives on Capacitation of Frozen-Thawed Ram Spermatozoa as a Potential Replacement for Estrous Sheep Serum. *Theriogenology* 84: 948-955.
- García-López N, Ollero M, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 1996. A Dextran Swim-up Procedure for Separation of Highly Motile and Viable Ram Spermatozoa from Seminal Plasma. *Theriogenology* 46: 141-151.

- Gillan L, Evans G, Maxwell WM. 1997. Capacitation Status and Fertility of Fresh and Frozen-Thawed Ram Spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 9: 481-487.
- Grasa P, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T. 2006. Signal Transduction Mechanisms Involved in *In Vitro* Ram Sperm Capacitation. *Reproduction* 132: 721-732.
- Guidobaldi HA, Teves ME, Unates DR, Anastasia A, Giojalas LC. 2008. Progesterone from the Cumulus Cells Is the Sperm Chemoattractant Secreted by the Rabbit Oocyte Cumulus Complex. *PLoS One* 3: 0003040.
- Harrison RA, Vickers SE. 1990. Use of Fluorescent Probes to Assess Membrane Integrity in Mammalian Spermatozoa. *J Reprod Fertil* 88: 343-352.
- Hunter RHF. 1988. *Transport of Gametes, Selection of Spermatozoa and Gamete Lifespan in the Female Tract*. New York: Springer Verlag.
- Kotwicka M, Skibinska I, Jendraszak M, Jedrzejczak P. 2016. 17 $\beta$ -Estradiol Modifies Human Spermatozoa Mitochondrial Function *In Vitro*: *Reprod Biol Endocrinol*. 2016;14(1):50. doi:10.1186/s12958-016-0186-5.
- Kurz A, Viertel D, Herrmann A, Muller K. 2005. Localization of Phosphatidylserine in Boar Sperm Cell Membranes During Capacitation and Acrosome Reaction. *Reproduction* 130: 615-626.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lishko PV, Botchkina IL, Kirichok Y. 2011. Progesterone Activates the Principal Ca<sup>2+</sup> Channel of Human Sperm. *Nature* 471: 387-391.
- Luconi M, Muratori M, Forti G, Baldi E. 1999. Identification and Characterization of a Novel Functional Estrogen Receptor on Human Sperm Membrane That Interferes with Progesterone Effects. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1670-1678.
- Miki K, Clapham DE. 2013. Rheotaxis Guides Mammalian Sperm. *Curr Biol* 23: 443-452.
- Mortimer D. 1994. Sperm Recovery Techniques to Maximize Fertilizing Capacity. *Reprod Fertil Dev* 6: 25-31.
- Perez-Cerezales S, Boryshpolets S, Eisenbach M. 2015. Behavioral Mechanisms of Mammalian Sperm Guidance. *Asian J Androl* 17: 628-632.
- Rago V, Aquila S, Panza R, Carpino A. 2007. Cytochrome P450 $\alpha$ , Androgen and Estrogen Receptors in Pig Sperm. *Reprod Biol Endocrinol* 5: 23.
- Rago V, Giordano F, Brunelli E, Zito D, Aquila S, Carpino A. 2014. Identification of G Protein-Coupled Estrogen Receptor in Human and Pig Spermatozoa. *J Anat* 224: 732-736.
- Roldan ER, Murase T, Shi QX. 1994. Exocytosis in Spermatozoa in Response to Progesterone and Zona Pellucida. *Science* 266: 1578-1581.
- Romarowski A, Sanchez-Cardenas C, Ramirez-Gomez HV, Puga Molina Ldel C, Trevino CL, Hernandez-Cruz A, Darszon A, Buffone MG. 2016. A Specific Transitory Increase in Intracellular Calcium Induced by Progesterone Promotes Acrosomal Exocytosis in Mouse Sperm. *Biol Reprod* 94: 27.
- Sagare-Patil V, Galvankar M, Satiya M, Bhandari B, Gupta SK, Modi D. 2012. Differential Concentration and Time Dependent Effects of Progesterone on Kinase Activity, Hyperactivation and Acrosome Reaction in Human Spermatozoa. *Int J Androl* 35: 633-644.
- Sebkova N, Cerna M, Ded L, Peknicova J, Dvorakova-Hortova K. 2012. The Slower the Better: How Sperm Capacitation and Acrosome Reaction Is Modified in the Presence of Estrogens. *Reproduction* 143: 297-307.

- Solakidi S, Psarra AM, Nikolaropoulos S, Sekeris CE. 2005. Estrogen Receptors Alpha and Beta (Eralpha and Erbeta) and Androgen Receptor (Ar) in Human Sperm: Localization of Erbeta and Ar in Mitochondria of the Midpiece. *Hum Reprod* 20: 3481-3487.
- Teves ME, Barbano F, Guidobaldi HA, Sanchez R, Miska W, Giojalas LC. 2006. Progesterone at the Picomolar Range Is a Chemoattractant for Mammalian Spermatozoa. *Fertil Steril* 86: 745-749.
- Tulsiani DR, Zeng HT, Abou-Haila A. 2007. Biology of Sperm Capacitation: Evidence for Multiple Signalling Pathways. *Soc Reprod Fertil Suppl* 63: 257-272.
- Vigil P, Toro A, Godoy A. 2008. Physiological Action of Oestradiol on the Acrosome Reaction in Human Spermatozoa. *Andrologia* 40: 146-151.
- Wang Y, Storeng R, Dale PO, Abyholm T, Tanbo T. 2001. Effects of Follicular Fluid and Steroid Hormones on Chemotaxis and Motility of Human Spermatozoa in Vitro. *Gynecol Endocrinol* 15: 286-292.
- Ward CR, Storey BT. 1984. Determination of the Time Course of Capacitation in Mouse Spermatozoa Using a Chlortetracycline Fluorescence Assay. *Dev Biol* 104: 287-296.

## 8. ANEXOS

### Resumen presentado al 20<sup>th</sup> Annual ESDAR (European Society for Domestic Animal Reproduction) Conference

#### Become a member

You are currently not an ESDAR member. Apply for your 2016 membership now.

[Membership application](#)

#### 20th Annual ESDAR Conference 2016

Lisbon, Portugal  
27/10/2016 - 29/10/2016

[Submit abstract](#) [Conference registration](#)

#### Logged on

T. Muino-Blanco  
Dpto. Bioquímica y Biol. Mol. y Cel. Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón

[My account](#) [LogOut](#)

### Abstract submission completed

Thank you for your abstract submission.  
We will inform you soon about the reviewers comments.

Sincerely  
Your ESDAR programme team.

---

### Abstract preview

#### An implemented dextran/swim-up technique with estradiol for the separation of a sperm subpopulation enriched in non-capacitated with no phosphatidylserine exposure cells

T. Muino-Blanco<sup>1</sup>, J. Peinado<sup>2</sup>, P. Nadal<sup>2</sup>, S. Gimeno<sup>2</sup>, A. Casao<sup>2</sup>, J. Cebrián-Pérez<sup>2</sup> and R. Pérez-Pé<sup>2</sup>

<sup>1</sup>University of Zaragoza, Dp. Biochemistry and Molecular and Cellular Biology, <sup>2</sup>Dpto. Bioquímica y Biol. Mol. y Cel. Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA). F. Veterinaria. Universidad de Zaragoza, Spain

Estradiol receptors are present on the ram sperm surface, but the information about specific effects of estradiol on ovine spermatozoa is very limited. In this study we used a ram sperm washing and selecting-procedure, a dextran/swim-up method, including two different concentrations of estradiol (E2) in the upper layer, one low (100 pM, LEsw) and one high (1 µM, HEsw). Both E2 concentrations resulted in a higher cell recovery rate than the standard swim-up (STsw, with no hormone) (59.2±1.1, 53.7±2.5 and 47.4±1.1 % for LEsw, HEsw and STsw respectively; P<0.001 for LEsw). The inclusion of E2 led to a significant increment in the percentage of non-capacitated (NC, CTC staining) and a decrease in the inverted-phosphatidylserine sperm rate (Annexin+) compared with the ejaculate (68.6±4.4, 74.2±4.6 and 53.4±5.0% of NC; 32.90±1.5, 33.52±3.1 and 48.27±4.4% of Ann+ sperm for LEsw, HEsw and ejaculate respectively; P<0.05), although there were no significant differences with STsw. None of the E2 concentrations assayed showed effect on motility (by CASA) or membrane integrity (CFDA+/PI-). With the aim to know whether the presence of estradiol influences the E2 receptor distribution, indirect immunofluorescence assays are now in progress comparing the STsw sample with the selected subpopulation in the presence of both E2 concentrations. Grants: CICYT AGL 2014-57863R, DGA-A26

[Contact](#)  
[General ESDAR Bank Account](#)  
[CONFERENCES](#)  
[CONFERENCE BIDS](#)  
[Job Advertisements](#)  
[Links](#)  
[Disclaimer](#)

28