



**Universidad**  
Zaragoza

  
**Facultad de Ciencias**  
**Universidad Zaragoza**



# **Estudio de la influencia de la progesterona sobre la selección espermática**

## **Study of the influence of progesterone on sperm selection**

---

Trabajo Fin de Grado

Autora:

Patricia Nadal Barón

Directora:

Rosaura Pérez Pé

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Grado en Biotecnología

Junio 2016

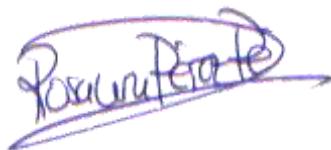


La Dra. Rosaura Pérez Pé, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza

INFORMA:

Que la alumna Dña. Patricia Nadal Barón, ha realizado bajo mi dirección, en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, su Trabajo Fin de Grado titulado "Estudio de la influencia de la progesterona sobre la selección espermática". Este trabajo cumple los objetivos recogidos en las Directrices TFG en Biotecnología, por lo que se considera procedente su presentación.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo la presente en Zaragoza a 20 de Junio de 2016.



Rosaura Pérez Pé

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 celebrará en Lisboa (Portugal) del 27 al 29 de Octubre de 2016. Se incluye como anexo el resumen enviado y aceptado.

Título: **“The inclusion of progesterone in the dextran/swim-up procedure increases the recovery of ram capacitated sperm rate.**

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

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
2.1. Progesterona y reproducción.....	3
2.2. Efectos de la progesterona en el espermatozoide.....	4
2.3. Mecanismos de orientación espermática .....	6
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>7</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>8</b>
4.1. Obtención del semen .....	8
4.2. Efecto de la presencia de progesterona en el medio de recogida del <i>swim-up</i> .....	8
4.2.1. Separación espermática mediante método <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 la motilidad espermática .....	10
4.2.4. Análisis de la integridad de la membrana plasmática (viabilidad).....	10
4.2.5. Análisis de la translocación de fosfatidilsíserina en la membrana espermática .....	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 de progesterona de membrana por inmunofluorescencia indirecta .....	13
4.3. Influencia de la progesterona en la orientación espermática.....	14
4.4. Análisis estadístico .....	15
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>16</b>
5.1. Efecto de la presencia de progesterona en el medio de recogida de <i>swim-up</i> .....	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 fosfatidilsíserina en la membrana espermática .....	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 .....	19
5.1.6. Determinación de la distribución del receptor de PG en la membrana espermática por inmunofluorescencia indirecta .....	20
5.2. Influencia de la progesterona en la orientación espermática.....	21
<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**

La progesterona (PG) es una hormona fundamental en la reproducción de los mamíferos que regula la expresión génica del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal por medio de receptores nucleares. Está presente en el tracto reproductor femenino, y dado que, el espermatozoide presenta receptores para esta hormona en la membrana plasmática, se ha especulado que la PG además, podría regular la funcionalidad espermática por medio de rápidas acciones no genómicas. Entre estas acciones podría incluirse el control de la capacitación, que es el conjunto de cambios que sufre el espermatozoide en el tracto reproductor femenino y que le confieren capacidad fecundante. Asimismo, también podría influir en la capacidad de guiar al espermatozoide hacia el ovocito, esencial para el éxito de la fecundación. Hasta la fecha no hay estudios sobre el efecto de la PG en la funcionalidad y en la orientación espermática en la especie ovina.

En consecuencia, el objetivo principal de este trabajo fue analizar el efecto de la PG sobre los espermatozoides ovinos, determinando su influencia en la funcionalidad espermática y su capacidad quimioatrayente.

Para ello, se realizó un proceso de selección espermática *in vitro* mediante la técnica de *swim-up/dextrano* añadiendo PG a dosis 100 pM o 1 µM en la capa superior de recogida y evaluando posteriormente el porcentaje de recuperación celular y la funcionalidad de los espermatozoides recuperados. Asimismo, se analizó la capacidad quimiotáctica de la PG, tanto en espermatozoides frescos como sometidos a un proceso de capacitación *in vitro*, utilizando una cámara de análisis de quimiotaxis y un software experimental desarrollado por el grupo.

Ambas dosis de PG ensayadas dieron lugar a un incremento estadísticamente significativo del porcentaje de recuperación celular y de espermatozoides capacitados respecto al control, si bien no tuvieron efecto en la motilidad, en el estado de la membrana plasmática (integridad de la misma y exposición de fosfadidilserina) y la distribución del receptor de la PG en la superficie de los espermatozoides recuperados. Además, se demostró la capacidad quimiotáctica de la PG sobre espermatozoides ovinos capacitados *in vitro*.

## **ABSTRACT**

Progesterone (PG) is an essential hormone in mammalian reproduction which regulates gene expression of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis by nuclear receptors. Spermatozoa have a PG receptor in the membrane and, as PG is present in the female reproductive tract, it has been proposed that PG could regulate their functionality through rapid non genomic actions. Among these actions, it could be included the control of capacitation, the changes undergone by sperm in the female reproductive tract that enables them to fertilize the oocyte. Likewise, PG could influence on spermatic guidance towards the oocyte, essential for the sperm-oocyte binding. Up to now, there are not studies about the effect of PG on spermatic orientation or functionality in ram sperm.

Therefore, the main aim of this project was to analyse the effect of PG on ram sperm: its chemoattractant ability and its influence on spermatic functionality.

Thus, we carried out an *in vitro* sperm selection by a dextran/*swim-up* procedure in which we included two different concentrations of PG, 100 pM or 1  $\mu$ M, in the upper layer. Later, we evaluated the cell recovery rate and the spermatic functionality. Additionally, we analysed the chemotactic ability of PG in fresh spermatozoa and in *in vitro* capacitated sperm with a chemotaxis camera and an experimental software developed by our group.

Both PG concentrations resulted in a significantly higher cell recovery and capacitated sperm rate than the *swim-up* control. Nevertheless, PG did not show any effect on sperm motility, membrane integrity (integrity and phosphatidylserine exposure) or distribution of PG receptor in the sperm membrane. Furthermore, it was demonstrated that PG is a chemoattractant for ram sperm.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1. Progesterona y reproducción**

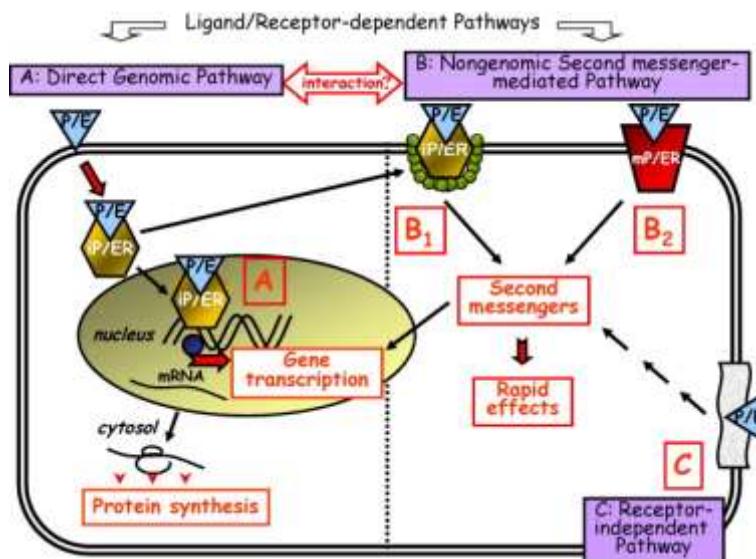
La progesterona (PG) es una hormona esteroidea que juega un papel fundamental en la regulación de los procesos reproductivos de los mamíferos. Su acción en las hembras de mamíferos ha sido muy estudiada, y entre la variedad de acciones descritas destaca su papel durante la fase luteal del ciclo estral así como en la preparación de la hembra para una posible gestación, facilitando la implantación del embrión. En cambio, la función de la PG en los machos es menos conocida, si bien el interés ha aumentado en las últimas décadas al descubrirse que también desempeña un rol importante en la fertilidad masculina.

A nivel molecular, esta hormona esteroidea regula la expresión génica del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal por medio de receptores nucleares. Además de esta acción genómica, la PG puede actuar de manera no-genómica en varios tipos celulares dando lugar a distintas respuestas en un corto intervalo de tiempo (Bishop *et al.* 2008).

La PG se sintetiza en los ovarios, glándulas adrenales y la placenta. En el tracto reproductor femenino se encuentra en el fluido folicular y en las cercanías del ovocito (Wang *et al.* 2001). El fluido folicular, que se libera al oviducto en el momento de la ovulación, se estima que contiene concentraciones del orden nanomolar de dicha hormona (Carson *et al.* 1981). Además, las células del *cúmulus* que rodean al ovocito secretan PG en concentraciones del orden micromolar (Teves *et al.* 2006). Evidentemente, la concentración concreta de PG a lo largo del tracto reproductor femenino es difícil de estimar debido a la influencia de distintos factores como el momento del ciclo estral, el número de células del *cúmulus* que rodean al ovocito en el momento de la ovulación y la especie animal de que se trate, existiendo probablemente un gradiente de concentración desde las proximidades del ovocito hasta las regiones más distales (Sagare-Patil *et al.* 2012).

Se ha postulado que la PG es capaz de regular de manera no genómica la funcionalidad de los espermatozoides puesto que son células transcripcionalmente inactivas y han de sufrir cambios muy drásticos en un entorno en el que esta hormona, junto con otras moléculas, se haya presente (Baldi *et al.* 2009).

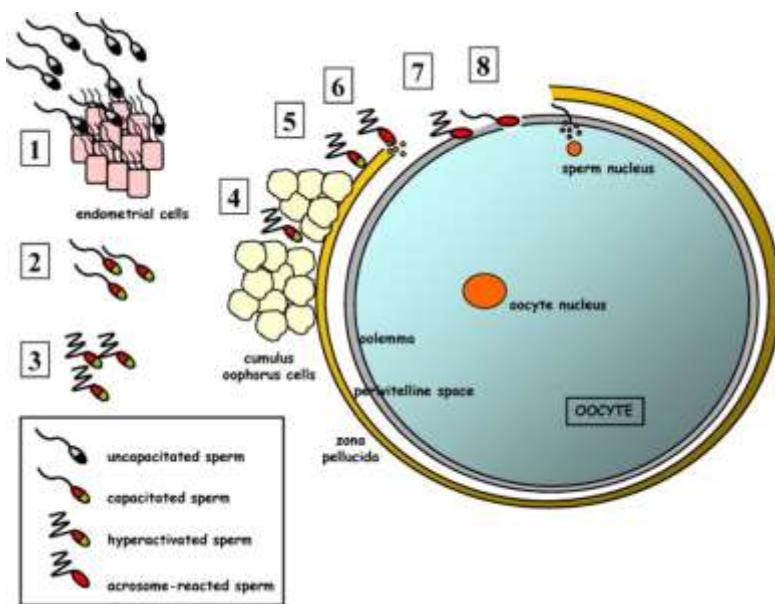
La forma en la que la PG ejerce estas rápidas acciones no-genómicas sobre los espermatozoides es todavía materia de discusión. Podría ser a través de los mismos receptores nucleares clásicos localizados en caveolas en la membrana plasmática o bien mediante su unión a receptores de membrana específicos, que podrían ser totalmente diferentes a los clásicos (Baldi *et al.* 2009) (Fig. 2.1). Diferentes trabajos a lo largo de las últimas décadas han mostrado evidencias de un tipo u otro de receptores 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 la especie ovina, nuestro grupo ha evidenciado recientemente la presencia de receptores de PG en espermatozoides (González-Arto 2013).



**Figura 2.1.** Mecanismos de acción propuestos de la progesterona en 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 un receptor de membrana diferente (B2), C) Ruta independiente del receptor (No evidencia experimental) (Baldi *et al.* 2009).

## 2.2. Efectos de la progesterona en el espermatozoide

A lo largo del tracto reproductor femenino, el espermatozoide sufre una compleja serie de eventos que le permite adquirir la capacidad fecundante. Este hecho, conocido como capacitación, implica cambios en la membrana plasmática (Gadella *et al.* 2008), la distribución del calcio intracelular (Lishko *et al.* 2011) y la activación de diferentes rutas de señalización celular (Grasa *et al.* 2006). Al final del proceso de capacitación el espermatozoide adquiere un movimiento denominado hiperactivación y que se caracteriza por movimientos desordenados de la cabeza y el flagelo para penetrar en el ovocito. Por último, sufre la reacción acrosómica, un proceso de exocitosis que le permite penetrar en la zona pelúcida del ovocito (Fig. 2.2).



**Figura 2.2.** Eventos del proceso de capacitación. 1) Interacción con células del endometrio. 2) Capacitación. 3) Hiperactivación. 4) Penetración a través de las células del *cúmulus* 5) Unión a la zona pelúcida 6) Reacción acrosómica. 7) Fusión a la membrana del ovocito. 8) Reacción cortical y entrada del núcleo espermático en el ovocito (Baldi *et al.* 2009).

Existen numerosos estudios sobre el efecto *in vitro* de la PG en el espermatozoide en diferentes especies de mamíferos, si bien no hay estudios apenes en la especie ovina.

Diferentes trabajos sugieren que la PG provoca la activación de diferentes rutas de señalización intracelular implicadas en los procesos anteriores. Entre ellas se encuentran la generación de AMP cíclico, la fosforilación de residuos de tirosinas, la activación de fosfolipasas y el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aunque no está claro el mecanismo exacto de acción (Baldi *et al.* 2009).

El espermatozoide necesita presentar una motilidad progresiva a lo largo del tracto reproductor femenino para poder llegar hasta el ovocito. La PG en concentraciones del orden nanomolar produce pequeñas oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que provocan cambios en la frecuencia de movimiento flagelar (Harper *et al.* 2004). Por otra parte, la incubación con PG a concentraciones 5-10  $\mu\text{M}$  de espermatozoides capacitados *in vitro* previamente, provoca un aumento de la motilidad progresiva en tiempos cortos (Sagare-Patil *et al.* 2012).

En cuanto al efecto de la PG en la viabilidad espermática, estudios recientes en la especie porcina sugieren que la PG favorece la supervivencia espermática a concentraciones entre 10 y 100 nM (De Amicis *et al.* 2012). Igualmente, la PG influye en el metabolismo del espermatozoide que le aporta la energía necesaria para llegar hasta el ovocito. Esta hormona modula la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enzima limitante en la ruta de las pentosas fosfato (Rago *et al.* 2014).

En cuanto a la capacitación espermática, se ha descrito que la PG estimula capacitación en la especie humana aunque el efecto se produce a concentraciones altas de la hormona (1-30  $\mu\text{M}$ ) que no se alcanzan en el fluido oviductal (Baldi *et al.* 2009). Además, tanto en la especie humana (Sagare-Patil *et al.* 2012) como en ratón (Roldan *et al.* 1994), diferentes estudios *in vitro* han mostrado que la PG es capaz de inducir el patrón de movimiento asociado a la capacitación (hiperactivación) a concentraciones entre 3 y 5  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, en otras especies como la equina (Neild *et al.* 2005) y la bovina (Therien *et al.* 2003) parece carecer de este efecto inductor de la capacitación.

No obstante, diferentes estudios han mostrado que la PG sí estimula el proceso de reacción acrosómica puesto que potencia la unión del espermatozoide a las proteínas ZP, una familia de glicoproteínas presentes en la capa externa del ovocito y principales inductoras de la reacción acrosómica en algunas especies (Neild *et al.* 2005; Witte *et al.* 2007). Recientemente, se ha visto tanto en la especie humana (Lishko *et al.* 2011) como en ratón (Romarowski *et al.* 2016) que la PG estimula un aumento de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  necesario para que suceda la reacción acrosómica. El efecto de la PG en el espermatozoide ovino es desconocido aunque en otras especies de mamíferos domésticos como la bovina, la equina, la porcina y la canina induce la reacción acrosómica dependiendo de la dosis (Witte *et al.* 2007).

Finalmente, en la especie ovina solo existe un estudio, el cual analiza la funcionalidad espermática tras la incubación con PG. Los resultados indican que la hormona no afecta a la viabilidad del espermatozoide y disminuye la motilidad, así como que la PG carece de efectos capacitantes en esta especie. No obstante, este trabajo se llevó a cabo con espermatozoides procedentes de muestras criopreservadas, y los propios autores apuntan a que el proceso de

criopreservación pudo provocar la pérdida del receptor de PG de la membrana plasmática (García-Alvarez *et al.* 2015).

### **2.3. Mecanismos de orientación espermática**

En los mamíferos, la orientación espermática en el oviducto parece ser esencial para la llegada con éxito al ovocito. Hasta la fecha, se han propuesto tres mecanismos diferentes, al menos en la especie humana: termotaxis (Bahat *et al.* 2006), reotaxis (Miki *et al.* 2013) y quimiotaxis (Armon *et al.* 2011) cada uno de los cuales es respuesta a un estímulo específico: gradiente de temperatura, flujo de fluido y gradiente de concentración, respectivamente. Entre estos mecanismos existen una serie de similitudes: solo son efectivos en espermatozoides capacitados y en los tres casos parece ser necesaria la adquisición del movimiento de hiperactivación (Perez-Cerezales *et al.* 2015). Tampoco hay que descartar que el movimiento guiado hacia el ovocito se deba a una combinación de varios de esos mecanismos.

Así, por una parte, se ha observado que en el lugar de fecundación del ovocito, la temperatura es de 1 a 2 °C mayor que en la entrada del oviducto, lo que permitiría al espermatozoide una orientación termotáctica. Y por otro lado, se han postulado diferentes sustancias presentes en el fluido folicular y/o secretadas por las células del *cúmulus* que rodean al ovocito (Bahat *et al.* 2006) como quimiotrayentes para espermatozoides de distintas especies de mamíferos. Entre las presentes en el fluido folicular se encuentran el péptido natriurético atrial (Zamir *et al.* 1993), la quimiocina RANTES (Isobe *et al.* 2002) y la PG (Teves *et al.* 2006). Sin embargo, es poco probable que sustancias presentes en el fluido folicular sean las responsables de la quimiotaxis *in vivo* porque para mantener el gradiente quimiotáctico se requeriría un suministro continuo del quimioatraventante durante el periodo de supervivencia del ovocito, lo que se contrapone al hecho de que el fluido folicular solo se libera en el momento de la ovulación (Perez-Cerezales *et al.* 2015). Por tanto, parece más probable que la/s sustancia/s quimioatraventante/s sea secretada por las células del *cúmulus*, lo que también incluiría a la PG entre los candidatos (Oren-Benaroya *et al.* 2008).

El papel quimiotáctico de la PG en mamíferos ha sido profundamente debatido en las últimas décadas debido a la complejidad que presenta el estudio de tal mecanismo. Diversos estudios demuestran esta acción quimioatraventante en la especie humana en concentraciones del orden picomolar (Teves *et al.* 2006) y en concentraciones del orden nanomolar en conejo (Guidobaldi *et al.* 2008). Sin embargo otros autores consideran que la PG sólo provoca una acumulación celular (Jaiswal *et al.* 1999).

Los mecanismos moleculares implicados en la acción quimiotáctica de la PG no están del todo claros. En la especie humana se propone que el canal de membrana CatSper estaría controlando la quimiotaxis del espermatozoide (Lishko *et al.* 2011). En la especie ovina, hasta el momento, no existen estudios al respecto.

### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

La PG es una hormona presente en el fluido folicular y en las cercanías del ovocito ya que es secretada por las células del *cúmulus* que lo rodean (Wang *et al.* 2001). Se ha descrito que dicha hormona esteroidea puede actuar de manera no genómica en varios tipos celulares (Bishop *et al.* 2008) posiblemente a través de receptores de membrana. Recientemente, se ha descrito en espermatozoides de la especie ovina la existencia de receptores de membrana para la PG (Baldi *et al.* 2009).

Por otra parte, esta PG se encontraría formando un gradiente de concentración desde las proximidades del ovocito hasta regiones más distales del tracto reproductor femenino (Sagare-Patil *et al.* 2012), lo que podría desencadenar una respuesta de quimioatracción en los espermatozoides, y en consecuencia, guiarlos hacia el ovocito. Esta correcta orientación espermática en respuesta a un estímulo es necesaria para el éxito de la fecundación. La acción quimiotáctica de la PG se ha demostrado en espermatozoides de algunas especies de mamíferos (Teves *et al.* 2006), pero hasta la fecha, no en ovino.

En vista a los antecedentes expuestos, la **hipótesis** que se plantea en este trabajo es que la PG, por medio de receptores de membrana, activa procesos de orientación quimiotáctica en el espermatozoide ovino y además, regula la funcionalidad espermática por medio de rápidas acciones no genómicas.

Por consiguiente, los **objetivos** del presente trabajo fueron los siguientes:

- 1.** Evaluar la influencia de la adición de PG en el medio de recogida de un método de separación espermática sobre el porcentaje de recuperación celular, la funcionalidad espermática y la distribución del receptor de PG en la superficie de los espermatozoides recuperados.
- 2.** Estudiar el posible efecto quimioatrayente de la PG sobre el espermatozoide ovino en espermatozoides frescos y capacitados *in vitro*.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Obtención del semen**

El semen se obtuvo a partir de moruecos adultos de raza *Rasa Aragonesa*, donados por ANGRA (Asociación Nacional de Ganaderos de *Rasa Aragonesa*) y estabulados en el Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Zaragoza. La extracción se realizó mediante el método de vagina artificial y se obtuvieron dos eyaculados consecutivos de cada semental.

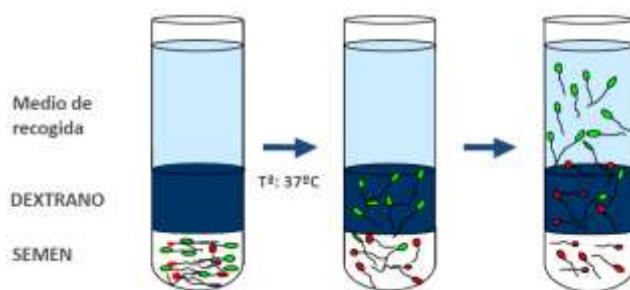
Si bien estudios previos de nuestro grupo de investigación demostraron la mayor calidad del segundo eyaculado frente al primero (Ollero *et al.* 1996), para llevar a cabo este trabajo se mezclaron ambos eyaculados para disponer de suficiente cantidad de muestra. Con el objetivo de eliminar las diferencias individuales, los eyaculados de los diferentes sementales también se mezclaron entre sí. Durante su transporte al laboratorio, se mantuvieron a 37 °C.

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

#### **4.2.1. Separación espermática mediante el método *swim-up/dextrano* y diseño experimental**

El método de *swim-up/dextrano* es un método de separación espermática que permite seleccionar una población con alta motilidad y viabilidad y eliminar el plasma seminal y restos celulares de los eyaculados. Se basa en la capacidad de los espermatozoides de “nadar” desde el eyaculado situado en el fondo de un tubo hacia la superficie atravesando una capa intermedia rica en dextrano. La técnica estándar de *swim-up* (Berger *et al.* 1985) incluye etapas de centrifugación que perjudican la calidad del espermatozoide ovino. Por esta razón, en este estudio se utilizó una variante de *swim-up* que no incluye este proceso, desarrollada para la especie humana (Alvarez *et al.* 1993) y adaptada a la especie ovina por nuestro grupo (García-López *et al.* 1996). El medio utilizado fue el MS (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 añadió penicilina (1,5 UI/ml) y estreptomicina (15 µg/ml) para evitar la contaminación. El pH del medio se ajustó a 6,5.

Se depositaron 0,5 ml de semen en el fondo de un tubo redondeado de 15 mm de diámetro, y sobre la muestra, se añadió una capa de 0,5 ml de medio MS-Dextrano (30 mg Dx/ml MS) dejando que se deslizara por las paredes del tubo para evitar la mezcla de las diferentes fases. Esta capa actúa como barrera física que dificulta el paso de espermatozoides con membrana alterada y con baja motilidad. Por encima de ella, se depositaron 1,5 ml de MS-A (5 mg albúmina sérica bovina (BSA)/ml MS) que constituye el medio de recogida de los espermatozoides y al contener BSA evita la aglutinación de los mismos (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Esquema del método de selección de espermatozoides mediante *swim-up/dextrano*

Se incubó a 37 °C durante 15 minutos y se recogieron 750 µl de la capa superior para seguidamente añadir el mismo volumen de medio MS-A. El proceso se repitió otras tres veces consecutivas obteniéndose un total de cuatro sobrenadantes. El primero se desecha por contener restos de plasma seminal y se trabaja posteriormente con la mezcla de los tres restantes, que es lo que denominaremos de aquí en adelante como muestra *swim-up* (S-up).

Para determinar el efecto de la PG, se ensayó la adición de dos concentraciones distintas de PG en la capa de recogida (MS-A). De esta forma, a partir de una misma muestra de eyaculado, se realizaron de manera simultánea, tres *swim-ups*:

- PG 100 pM: Incluye PG a una concentración de 100 pM (en DMSO) en el medio de recogida.
- PG 1 µM: Incluye PG a una concentración de 1 µM (en DMSO) en el medio de recogida.
- Control S-up: Para descartar el efecto del solvente en el que está disuelta la PG, al *swim-up* control se le adicionó DMSO en la misma proporción que las muestras con PG (1/10.000 (v/v))

Las concentraciones de hormona ensayadas se decidieron en base a las estimaciones de la concentración fisiológica de PG en el tracto reproductor femenino (Wang *et al.* 2001), así como las usadas en trabajos de otros autores que estudian el efecto de dicha hormona en los espermatozoides (Teves *et al.* 2006; Guidobaldi *et al.* 2008; Lishko *et al.* 2011).

Las muestras recogidas de los 3 *swim-ups* tras el periodo de incubación correspondiente constituyen, junto con la muestra de eyaculado, los 4 grupos experimentales del primer objetivo este trabajo. En ellos se analizaron 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 PG en la superficie espermática mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI).

A continuación se detalla la metodología empleada para la determinación de cada parámetro.

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

La determinación de la concentración espermática se realizó mediante una cámara de Neubauer usando un microscopio Nikon eclipse 50i; (Nikon, Tokyo, Japan).

La muestra de eyaculado se diluyó 1/2000 (v/v) y las muestras recogidas tras el *swim-up* se diluyeron 1:100. En ambos casos, el diluyente empleado fue agua para evitar el movimiento de los espermatozoides y facilitar el recuento. Se colocó una gota de 6 µl en la cámara de Neubauer y el recuento se realizó mediante un microscopio de contraste de fases con un

objetivo 10x. Se contaron las células existentes en 16 cuadrículas de la cámara (4 en cada uno de los cuadrantes). La concentración se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{células}}{\text{ml}} \right) = n^{\circ} \text{ células contadas} \times 10^4 \times \frac{1}{\text{Dilución}}$$

El porcentaje de recuperación celular se halló mediante la siguiente fórmula:

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

#### 4.2.3. Evaluación la motilidad espermática

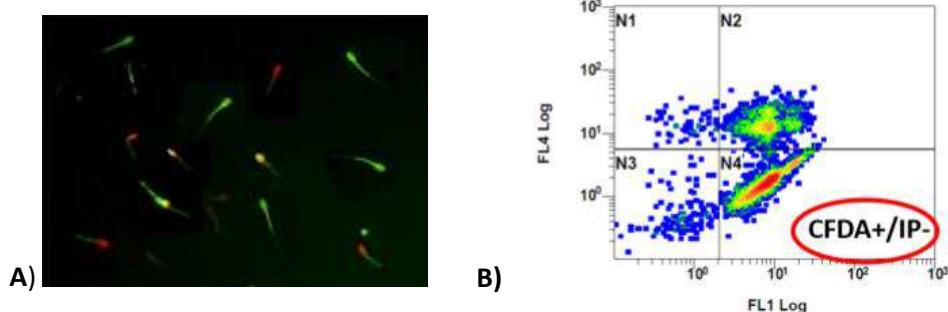
La motilidad espermática se analizó mediante un sistema de análisis computerizado CASA (ISAS1.0.4; Proiser SL, Valencia, España) que emplea una cámara de video (Basler A312f; Basler Vision, Exton, PA) montada en un microscopio de contraste de fases (Nikon eclipse 50i, Nikon, Tokyo, Japan).

La muestra de semen fresco se diluyó 1:100 y las muestran recogidas tras el *swim-up* 1:5 en medio PHS (Phosphate HEPES Sucrose: sacarosa 0.25 M, EGTA 0,1 mM, tampón HEPES 10% (v/v), tampón fosfato sódico 4 mM, pH 7,5). Se colocó una gota de 7 µl de la muestra a analizar entre un portaobjetos y un cubreobjetos, previamente atemperados a 37 °C. Se evaluaron al menos 5 campos por cada gota usando un objetivo 10x. Se analizaron los parámetros de motilidad total (el porcentaje de espermatozoides que se mueven), y la motilidad progresiva (el porcentaje de espermatozoides que se desplazan de forma recta) facilitados por el software del sistema.

#### 4.2.4. Análisis de la integridad de la membrana plasmática (viabilidad)

La viabilidad se determinó mediante la doble tinción con ioduro de propidio y diacetato de carboxifluoresceína (IP/CFDA) (Harrison *et al.* 1990).

El CFDA, incoloro, es capaz de atravesar la membrana plasmática de los espermatozoides y es hidrolizado mediante esterasas a carboxifluoresceína, verde, en aquellos que mantengan su actividad enzimática. Por lo tanto, los espermatozoides viables se observarán teñidos de verde. El IP es un agente intercalante que se une al ADN. Si las células han perdido su integridad de membrana penetra en ellas y se une a su material genético lo que da lugar a fluorescencia roja en los espermatozoides no viables (Figura 4.2).



**Figura 4.2. A)** Doble tinción de los espermatozoides ovinos con ioduro de propidio y diacetato de carboxifluoresceína como se observaría con microscopía de fluorescencia en filtro 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 evaluado por citometría de flujo utilizando los fotodetectores FL1 y FL4.

La muestra fresca se diluyó 1:500 y las obtenidas tras el *swim-up* 1:60, en medio PHS, para alcanzar en ambos casos una concentración de  $6 \times 10^6$  células/ml. Se añadieron 3  $\mu\text{l}$  de formaldehido (5% v/v), 3  $\mu\text{l}$  de CFDA (0,46 mg/ml en DMSO) y 3  $\mu\text{l}$  de IP. La mezcla se incubó 10 minutos a 37 en oscuridad.

La tinción puede ser evaluada tanto por microscopía de fluorescencia como por citometría de flujo. En el presente trabajo se utilizó el citómetro Beckman Coulter FC 500 (Beckman Coulter INC., Pasadena, CA, EEUU) que usa un láser de argón a 488 nm. La determinación de la viabilidad espermática se realizó con los filtros FL1-525  $\pm$  5 nm (para CFDA) y FL4-675  $\pm$  5 nm (para IP). Se contaron 20.000 eventos por cada muestra.

#### **4.2.5. Análisis de la translocación de fosfatidilserina en la membrana espermática**

La fosfatidilserina (FS) es un fosfolípido presente en condiciones normales, en la cara interna de la membrana y que, en determinados situaciones, como procesos apoptóticos se transloca a la cara externa. La inversión de FS se analizó mediante la tinción con FITC-Anexina V (Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU). La Anexina (Ann) es una proteína con alta afinidad por la FS y por lo tanto marcará las células en las que se ha producido su translocación con fluorescencia verde al estar acoplada a un fluorocromo. Esta tinción se combinó con ioduro de propidio (IP) que permite diferenciar a las células que tienen la membrana dañada, con fluorescencia roja, de las que conservan la integridad de membrana.

Para el procedimiento de tinción se tomaron 10  $\mu\text{l}$  de la muestra diluida previamente en medio PHS (1:100 en el caso del eyaculado y 1:5, en el caso de las muestras obtenidas tras el *swim-up*) y se añadieron 250  $\mu\text{l}$  de tampón de anexina 1X (Binding Buffer Apoptosis Detection Kit). En oscuridad, se añadieron 1  $\mu\text{l}$  de anexina-FITC y 3  $\mu\text{l}$  de IP y se incubó 10 minutos en oscuridad a 37 °C. Se añadieron 4  $\mu\text{l}$  de formaldehido, que actúa como agente fijador, y pasados cuatro minutos, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de tampón de unión de la anexina 1X.

El análisis por citometría de flujo permitió distinguir cuatro subpoblaciones celulares: células sin inversión de FS y membrana intacta (Ann-/IP-), células sin inversión de FS y membrana dañada (Ann-/IP+), células con inversión de FS y membrana intacta (Ann+/IP-), y células con inversión de FS y membrana dañada (Ann+/IP+). Se utilizaron los filtros FL1-525  $\pm$  5 nm (para Ann) y FL4-675  $\pm$  5 nm (para IP) del citómetro de flujo.

#### **4.2.6. Evaluación del estado de capacitación**

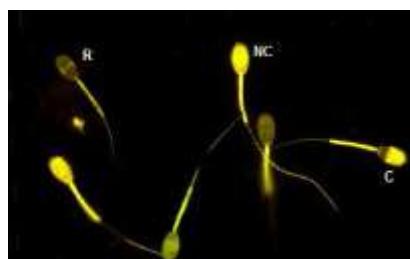
##### **4.2.6.1. Tinción con clorotetraciclina**

El estado de capacitación se estudió gracias a la tinción con clorotetraciclina (CTC). La CTC es un antibiótico que penetra al interior celular donde se une al ión calcio y origina diferentes patrones de fluorescencia en función de la distribución de este catión, que varía dependiendo del grado de capacitación (Ward *et al.* 1984). Esta técnica fue validada posteriormente por nuestro grupo para el estudio del estado de capacitación en la especie ovina (Grasa *et al.* 2006).

Para realizar la tinción se diluyeron previamente las muestras en medio PHS (1:100 en el caso del eyaculado y 1:5, en el caso de las muestras obtenidas tras el *swim-up*) hasta una concentración de  $3 \times 10^7$  células/ml. Se mezclaron 20  $\mu\text{l}$  de muestra diluida con 20  $\mu\text{l}$  de

solución CTC (2 mg de CTC disueltos en 5 ml de un tampón compuesto por Tris 20mM, cisteína 5  $\mu$ M y NaCl 130 mM, pH 7,8) y 5  $\mu$ l de un agente fijador (1,25% p/v de paraformaldehído en un tampón TRIS-HCl 0,5 M). La mezcla se incubó a 4 °C durante 1 hora en oscuridad. Posteriormente, se depositaron sobre un portaobjetos 3  $\mu$ l de trietilnediamino 0,22M (DABCO) diluido en glicerol:PBS (9:1 v/v) junto con 6  $\mu$ l de cada muestra. 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 oscuridad.

Las muestras se analizaron mediante 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). Se utilizó el objetivo de inmersión con un aumento 100x. Se contaron 200 células de cada muestra. Se distinguieron tres patrones de fluorescencia: espermatozoides no capacitados (fluorescencia uniforme en toda la cabeza), espermatozoides capacitados (fluorescencia en la región anterior de la cabeza) y espermatozoides reaccionados (sin fluorescencia o una banda a nivel ecuatorial) (Gillan *et al.* 1997) (Figura 4.3).



**Figura 4.3.** Espermatozoides ovíos 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**  
El estado de capacitación se evaluó también con el estudio de la fosforilación en residuos de tirosinas de las proteínas espermáticas puesto que es otro de los eventos que tiene lugar durante el proceso de capacitación. La detección de la fosforilación de los residuos de tirosinas de las proteínas espermáticas se realizó en los grupos experimentales control S-up, PG 100 pM y PG 1  $\mu$ M. El proceso consta de dos etapas diferenciadas, extracción de proteínas espermáticas y SDS-PAGE e inmunoblotting.

#### Extracción de proteínas espermáticas

Las proteínas espermáticas se extrajeron por el método descrito por Colás y cols. (Colas *et al.* 2008). Se preparó 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 fosfatases (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Se añadieron 100  $\mu$ l de medio de extracción a 200  $\mu$ l de muestras recogidas tras el *swim-up*. La mezcla se incubó durante 5 minutos a 100 °C en baño de arena. A continuación, se centrifugó a 15.000 x g durante 5 minutos, a temperatura ambiente y se recogió el sobrenadante. Por último, se añadió 2-mercaptopropano (5%) y glicerol (1%) y los lisados se almacenaron a -20 °C.

#### SDS-PAGE e Inmunoblotting

Las proteínas se separaron en una dimensión siguiendo el método Laemmli (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, fueron transferidas a una membrana de Immobilon-P (Millipore, Temecula, CA, USA), utilizando una unidad de transferencia en húmedo, modelo Mini-Protean 3 Cell y el modulo Mini Trans-BlotR de BioRad.

Una vez realizada la transferencia de las proteínas, los sitios no específicos de las membranas se bloquearon incubándolas 1 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% BSA (v/v), a temperatura ambiente.

La detección de la fosforilación de tirosinas de las 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 (clone 4G10R, Millipore, Temecula, CA, USA), 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 a temperatura ambiente en semioscuridad. Finalmente, las membranas se escanearon utilizando el Odyssey Clx (Li-Cor Biosciences). Además las membranas se tiñeron con azul Coomassie durante 30 minutos y se destiñeron con 30% de metanol y con 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, USA).

#### **4.2.7. Determinación de la distribución del receptor de progesterona de membrana por inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

Se decidió estudiar la localización del receptor de PG en los espermatozoides de los distintos grupos experimentales para analizar la existencia de cambios en su distribución como respuesta a la presencia de la PG como ha sido descrito en algunas especies como la porcina (Wu *et al.* 2006).

Para una correcta visualización de las muestras tras la IFI es recomendable que la concentración sea de  $4 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Para ello la muestra se diluyó con 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 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 4 µl de cada suspensión de células en un portaobjetos polilisinado (Superfrost Plus, ThermoScientific) 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.

Posteriormente, se bloqueó con BSA al 5% en PBS durante toda la noche para evitar la unión inespecífica. Al día siguiente, se volvieron a lavar las muestras, se añadieron 40 µl de

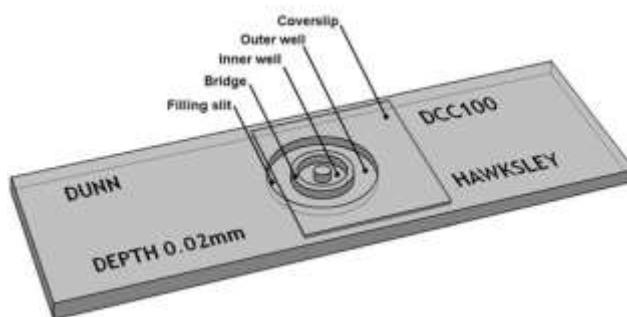
anticuerpo primario (anticuerpo IgG policlonal de conejo contra el receptor de PG región C-19, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EEUU) diluido 1:25 en PBS con BSA al 1% (v/v) y se dejó incubando toda la noche.

Tras la incubación, se realizaron otros tres lavados y se añadió el anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo (Alexa Fluor 488 anti-conejo generado en pollo, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU). Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras otros tres lavados, se montaron los portaobjetos con DABCO 0,22 M en solución de glicerol:PBS, 9:1, para disminuir la perdida 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 de cada muestra. Se identificaron tres patrones: marcaje en la región acrosomal y en la banda ecuatorial, marcaje en la banda ecuatorial y marcaje de menor intensidad e inespecífico en toda la cabeza del espermatozoide.

#### **4.3. Influencia de la progesterona en la orientación espermática**

La capacidad quimiotáctica de los espermatozoides se analizó mediante un sistema de análisis computerizado desarrollado recientemente por nuestro grupo de investigación basado en el programa de software libre ImageJ (ImageJ Casa Biozar) que emplea una cámara de video (acA1920-155uc, Basler, Exton, PA) conectada a un microscopio de contraste de fases (Nikon eclipse 50i, Nikon, Tokyo, Japan).

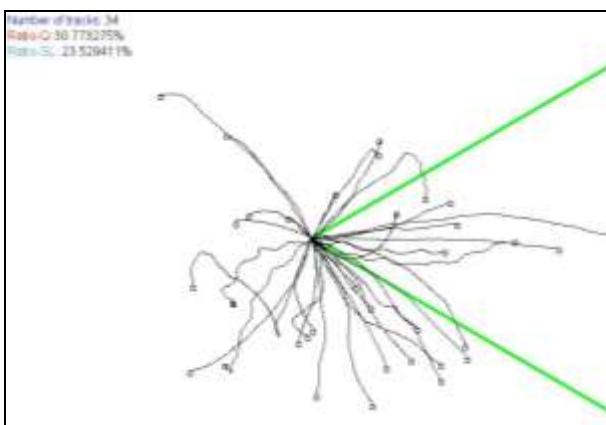


**Figura 4.4.** Esquema de la cámara Dunn

El estudio se realizó utilizando una cámara Dunn (Figura 4.4). La cámara consiste en 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 de espermatozoides se coloca en el pocillo interior y la solución con la sustancia quimioatrayente en el pocillo exterior lo que crea un gradiente de concentración radial. Se evalúa el porcentaje de espermatozoides que son capaces de salir del pocillo central, atravesar el puente y llegar hasta el pocillo exterior. El video se graba en la región del puente.

El programa desarrollado detecta las coordenadas de la trayectoria de los espermatozoides y calcula y dibuja las trayectorias normalizándolas a un mismo punto de referencia. Se selecciona una región cónica del plano para delimitar el área donde existe gradiente de hormona (cono quimiotáctico) (Figura 4.5). A partir de estos datos, halla dos ratios, ratio Q (porcentaje de espermatozoides cuya dirección instantánea en cada frame entra dentro del

cono quimiotáctico) y ratio SL (porcentaje de espermatozoides cuya trayectoria entra dentro del cono quimiotáctico en base a su posición inicial y final únicamente) que nos permiten evaluar la existencia de quimiotaxis.



**Figura 4.5.** Figura devuelta por el programa tras el análisis. Se muestran tres elementos: el cono quimiotáctico (en verde), las trayectorias relativas de los espermatozoides (centro) y arriba a la izquierda, los ratios quimiotácticos y el número de espermatozoides detectados

La quimiotaxis se ha descrito en otras especies únicamente en espermatozoides capacitados (Bahat *et al.* 2006). Por ello, se evaluaron dos grupos experimentales: espermatozoides procedentes de swim-up control y espermatozoides capacitados *in vitro*.

La capacitación de los espermatozoides se realizó con alícuotas de  $1,6 \times 10^8$  céls/ml en una estufa de incubación a 39 °C, con 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad. Para inducir la capacitación se empleó el medio TALP completo (NaCl 100 mM, KCl 3,1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 mM, lactato sódico 21,6 mM, CaCl<sub>2</sub> 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 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 1mM, cafeína 1 mM, teofilina 1mM, ácido okadoico 0,2 μM, metil-β-ciclodextrinas 2,5mM) con capacidad de inducir la capacitación *in vitro* de los espermatozoides ovinos (Colas *et al.* 2008).

Se colocaron 90 μl de medio con la sustancia quimioatravante en el pocillo exterior y 30 μl de muestra de espermatozoides diluida 1:10 y se cubrió con un cubreobjetos. Se grabó un video durante 3 segundos y se analizó con el programa desarrollado. El medio colocado el pocillo exterior fue mHTF con las dos concentraciones de PG utilizadas en el ensayo anterior (100 pM y 1 μM), o con 1/10000 (v/v) de DMSO como control tal y como se describió anteriormente.

#### 4.4. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el software *GradPad InStat* (5.01; San Diego, CA, USA). Se utilizó un análisis de chi-cuadrado para analizar la existencia de diferencias significativas en el porcentaje de recuperación, en la motilidad, en la viabilidad, en el estado de capacitación y translocación de FS y en la inmunolocalización del receptor de PG y en el análisis de quimiotaxis y se empleó un análisis de varianza (one-way ANOVA) para la cuantificación del Western de fosfotirosinas. Los resultados se muestran como la media ± S.E.M. (error estándar de la media).

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1. Efecto de la presencia de progesterona en el medio de recogida de *swim-up* sobre los espermatozoides.**

En esta primera parte del trabajo se analizó el efecto causado en los espermatozoides por la adición de PG en el medio de recogida de la técnica de selección espermática *swim-up*.

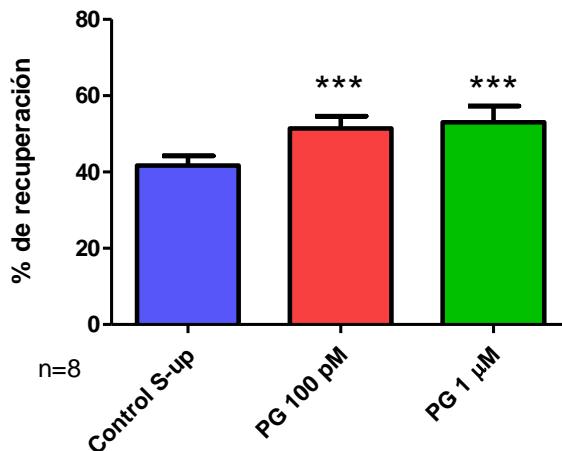
#### **5.1.1 Concentración y porcentaje de recuperación**

La inclusión de PG en la capa de recogida dio como resultado una mayor concentración de espermatozoides en comparación con el *swim-up* control, aunque las diferencias no fueron significativas (Tabla 5.1).

**Tabla 5.1.** Concentración de espermatozoides en las muestras control *swim-up* y con progesterona 100 pM y 1 µM. Los resultados se muestran como media ±SEM de 8 experimentos.

Concentración ( $10^8$ espermatozoides/ml)			
Eyaculado	Control S-up	PG 100 pM	PG 1 µM
$35,40 \pm 4,15$	$3,21 \pm 0,32$	$3,97 \pm 0,40$	$4,17 \pm 0,37$

Sin embargo, al analizar el porcentaje de recuperación con respecto al eyaculado, éste sí fue significativamente mayor para las muestras seleccionadas en presencia de PG en comparación con el *swim-up* control ( $P<0,001$ ;  $n=8$ ) (Figura 5.1).



**Figura 5.1.** Porcentaje de espermatozoides recogidos tras el *swim-up* en cuyo medio de recogida se añadió DMSO 1:10000 (Control S-up), o progesterona 100 pM (PG 100 pM) o 1 µM (PG 1 µM). Los resultados se muestran como media ± SEM de 8 experimentos. \*\*\*  $P<0,001$  respecto de la muestra control S-up.

Los resultados obtenidos sugieren que la PG presente en el medio de recogida podría ejercer cierto efecto quimoatravante sobre los espermatozoides ovino que daría lugar a una mayor migración de los espermatozoides hacia dicha capa. La capacidad quimoatravante de la PG ha sido descrita por varios grupos (Oren-Benaroya *et al.* 2008; Perez-Cerezales *et al.* 2015) lo que avalaría las observaciones realizadas.

### 5.1.2. Evaluación de la motilidad espermática

La motilidad espermática total no varió significativamente entre los distintos tipos de *swim-up*, como se aprecia en la tabla 5.2.

El aumento de la motilidad total tras el proceso de selección con respecto al eyaculado fue pequeño y en cualquier caso no significativo. Estos resultados se podrían explicar por el hecho de que la mayoría de experimentos ( $n=7$ ) fueron realizados en la época reproductiva para el ganado ovino (septiembre-marzo) en la que la calidad seminal es muy buena. Estudios previos en la especie ovina demostraron que el porcentaje de mejora de la motilidad espermática tras un proceso de *swim-up* depende de la calidad de la muestra siendo mayor el aumento de motilidad cuanto peor es esta (García-López *et al.* 1996). En cuanto a la motilidad progresiva tampoco se observaron efectos significativos (Tabla 5.2).

**Tabla 5.2.** Porcentaje de espermatozoides mótiles totales y mótiles progresivos en las muestras eyaculado y *swim-up* (Control S-up y progesterona 100 pM y 1  $\mu$ M). Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM de 10 experimentos.

Motilidad (% espermatozoides mótiles)				
	Eyaculado	Control S-up	PG 100 pM	PG 1 $\mu$ M
<b>Mótiles totales</b>	77,50 $\pm$ 3,66	82,20 $\pm$ 3,04	83,30 $\pm$ 2,18	83,70 $\pm$ 2,02
<b>Mótiles progresivos</b>	39,90 $\pm$ 1,93	35,40 $\pm$ 8,22	37,90 $\pm$ 2,25	41,90 $\pm$ 2,79

### 5.1.3. Análisis de la integridad de la membrana plasmática (viabilidad)

El análisis de la viabilidad tampoco evidenció diferencias significativas al comparar los distintos tipos de *swim-up*, ni comparando estos con el eyaculado (Tabla 5.3). Al igual que ocurría con la motilidad, los experimentos se realizaron en época reproductiva en su mayoría ( $n=7$ ) y por lo tanto, al partir de una muestra con una calidad seminal buena no se consiguió una mejora significativa de la viabilidad.

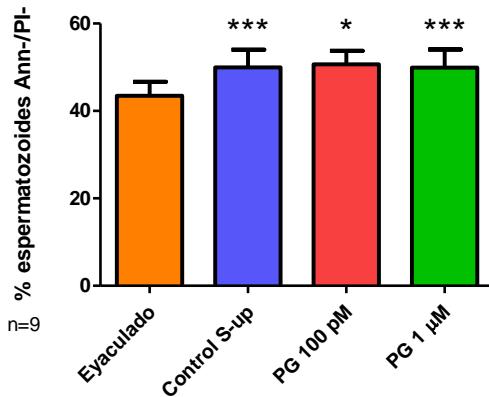
**Tabla 5.3.** Porcentaje de espermatozoides viables en las muestras eyaculado y *swim-up* (Control S-up y progesterona 100 pM y 1  $\mu$ M). Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM de 10 experimentos.

Viabilidad (% espermatozoides viables)				
Eyaculado	Control S-up	PG 100 pM	PG 1 $\mu$ M	
70,26 $\pm$ 1,20	71,15 $\pm$ 2,44	71,94 $\pm$ 2,65	70,08 $\pm$ 2,71	

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

Como se puede observar en la Figura 5.2, en todas las muestras seleccionadas se produjo un aumento significativo del porcentaje de espermatozoides con membrana intacta y sin translocación de FS (Ann-/IP-) respecto del eyaculado ( $P<0,05$ ;  $n=9$ ). Esto nos indica que con la técnica de *swim-up* se seleccionó una población espermática de mayor calidad, Enriquecida en células sin manifestaciones apoptóticas, a pesar de que no se consiguió aumentar significativamente otros parámetros como la motilidad o la viabilidad.

Cuando comparamos los tres tipos de *swim-up*, la presencia de PG en el medio de recogida no tuvo ningún efecto estadísticamente significativo en el porcentaje de espermatozoides con rasgos apoptóticos con respecto a la muestra control S-up.

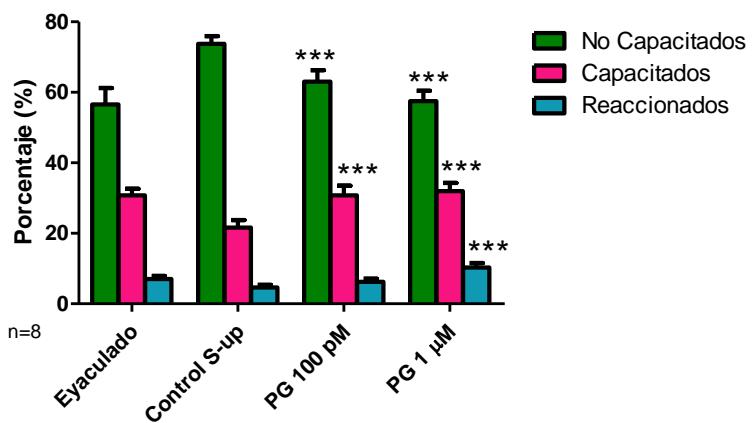


**Figura 5.2.** Porcentaje de espermatozoides con integridad de membrana y sin translocación de fosfatidilserina recogidos en las muestras de eyaculado y *swim-up* (Control S-up y progesterona 100 pM y 1  $\mu$ M). Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM de 9 experimentos. \* P<0,05 \*\*\*P<0,001 respecto de la muestra de eyaculado.

### 5.1.5. Evaluación del estado de capacitación

#### 5.1.5.1 Tinción con clorotetraciclina

Como se muestra en la figura 5.3, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el estado de capacitación entre la muestra de *swim-up* control y las recogidas en un medio en presencia de PG. En concreto, se produjo un aumento altamente significativo del número de espermatozoides capacitados lo que conllevó un descenso de espermatozoides no capacitados en las muestras seleccionadas con PG 100 pM y PG 1  $\mu$ M con respecto de la muestra de *swim-up* control (P<0,001; n=8).



**Figura 5.3.** Porcentaje de espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados en las muestras eyaculado y *swim-up* (Control S-up y progesterona 100 pM y 1  $\mu$ M). Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM de 8 experimentos. \*\*\*P<0,001 respecto de la muestra control S-up.

El hecho de que la adición de PG en la capa de recogida aumente el porcentaje de espermatozoides capacitados recuperados podría ser debido a que esta hormona produzca la capacitación de los espermatozoides *in vitro*, es decir, la unión de la PG a su receptor produciría el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  necesario para iniciar el proceso de capacitación, como se ha demostrado en la especie humana para tiempos de incubación largos (Lishko *et al.* 2011). No

obstante, el corto periodo de tiempo en el que los espermatozoides estuvieron en contacto con la hormona nos lleva a descartar esta hipótesis.

Otra posible explicación sería que la PG ejerza un efecto quimioatravante sobre la población de espermatozoides capacitados presentes en el eyaculado, y de este modo aumentaría el porcentaje de espermatozoides capacitados en el medio de recogida. Esta hipótesis se vería apoyada por el hecho de que la quimiotaxis ha sido observada únicamente en espermatozoides capacitados *in vitro* (Perez-Cerezales *et al.* 2015).

Por otro lado también se observó un aumento significativo del número de espermatozoides reaccionados (Figura 5.2) ( $P<0,001$ ,  $n=8$ ) en las muestras seleccionadas en presencia de PG 1  $\mu\text{M}$  respecto del *swim-up* control, lo que nos sugiere que la PG pudo inducir la reacción acrosómica en espermatozoides que se encontraran en fase final de capacitación.

Si comparamos el efecto obtenido con ambas concentraciones de PG, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ellas ni en el porcentaje de recuperación celular (Figura 5.1), ni en el porcentaje de espermatozoides capacitados (Figura 5.2) lo que nos sugiere que se pudo producir una saturación del receptor de PG a concentraciones altas de hormona.

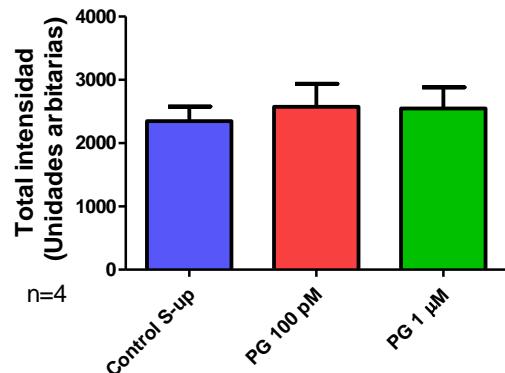
#### **5.1.5.2 Evaluación de la fosforilación en residuos de tirosinas**

Como se aprecia en la figura 5.4, correspondiente a una membrana representativa de varios análisis de fosforilación en residuos de tirosina de las proteínas espermáticas, no se observaron diferencias significativas entre las muestras seleccionadas en presencia de PG y el *swim-up* control. En la figura 5.5 se representan los resultados de la cuantificación densitométrica de la fosforilación en residuos de tirosinas.

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 este estudio, la selección espermática en presencia de PG dio como resultado un aumento de espermatozoides capacitados con respecto al *swim-up* control en la evaluación por tinción con CTC, y sin embargo este no se reflejó en un incremento en fosforilación de residuos de tirosina. Esto se explicaría porque la capacitación es un proceso secuencial que implica varias rutas de señalización de señal, y un compuesto puede tener efecto sobre una de las manifestaciones del proceso, como el cambio en la localización intracelular del calcio evidenciado por la tinción con CTC, y no sobre otras, como la fosforilación de tirosinas. En el caso del espermatozoide ovino se ha demostrado que para iniciar la fosforilación en residuos de tirosina es necesario un gran incremento en los niveles de cAMP (Colas *et al.* 2008), y puede que la incubación a tiempos tan cortos con PG durante el proceso de *swim-up* no permita este incremento.



**Figura 5.4.** Western-blot representativo de los obtenidos con anticuerpos anti-fosforoisina de proteínas extraídas de espermatozoides de las muestras de *swim-up*: control (1), progesterona 100 pM (2) y progesterona 1  $\mu$ M (3). PM= marcador de peso molecular de 10 a 250 kDa.

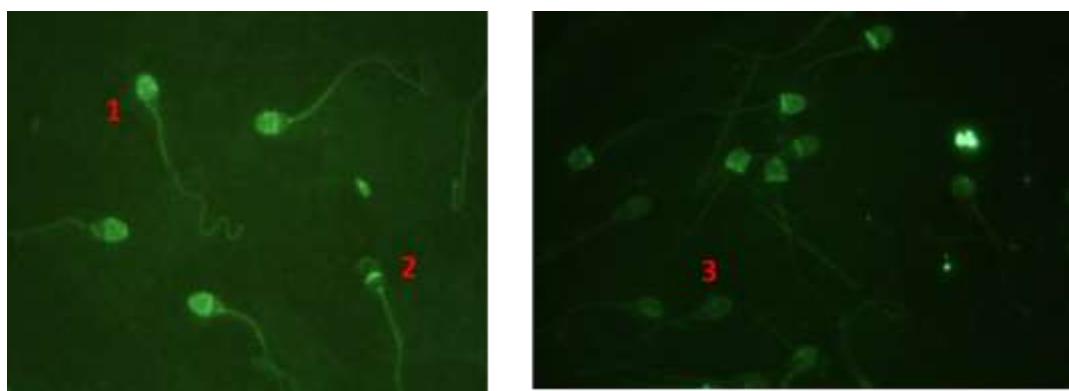


**Figura 5.5.** Cuantificación por densitometría del total de proteínas fosforiladas en tirosinas de las muestras espermáticas control S-up, progesterona 100pM y 1  $\mu$ M Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM de 4 experimentos.

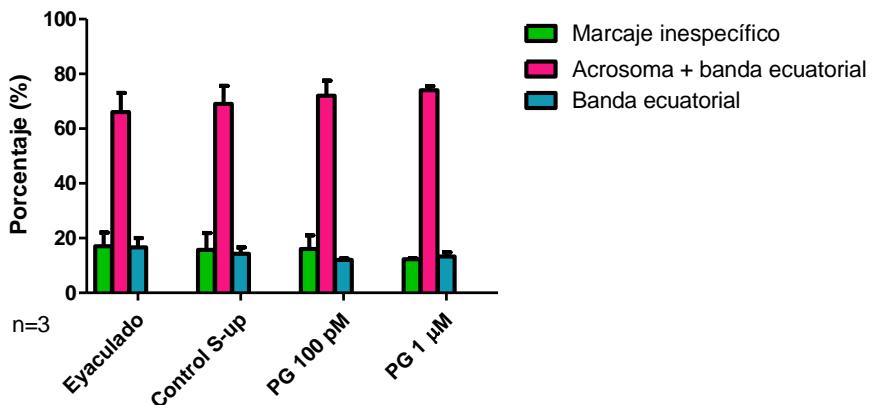
#### 5.1.6. Determinación de la distribución del receptor de PG en la membrana espermática por inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Se analizó la distribución del receptor de PG en la membrana del espermatozoide ovino para evaluar la existencia de cambios en la distribución que pudieran indicar procesos de internalización o exposición del receptor en respuesta a la PG.

Los resultados obtenidos revelaron la existencia de tres subtipos de marcaje: un marcaje mayoritario en la región acrosomal y en la banda ecuatorial (Figura 5.6, 1) y dos minoritarios, uno en la banda ecuatorial (Figura 5.6, 2) y otro de menor intensidad en toda la cabeza del espermatozoide que podría corresponder con un marcaje inespecífico (Figura 5.6, 3). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de los distintos subtipos entre los diferentes grupos experimentales (Figura 5.7).



**Figura 5.6.** Imágenes representativas de la distribución del receptor de progesterona en la membrana, identificado mediante inmunofluorescencia indirecta y evaluado por microscopía de fluorescencia. Los patrones identificados fueron marcaje de mayor intensidad en acrosoma y banda ecuatorial (1), marcaje en la banda ecuatorial (2) y marcaje inespecífico de menor intensidad en la cabeza del espermatozoide (3).



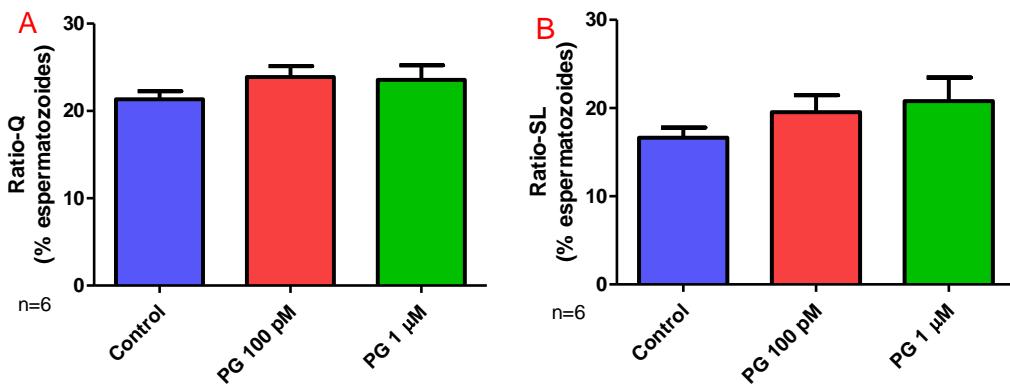
**Figura 5.7.** Porcentaje de distintos patrones de distribución del receptor de PG en la membrana del espermatozoide ovino, evaluados mediante IFI, en las muestras de eyaculado, control *swim-up*, PG 100 pM y PG 1  $\mu$ M. Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM de 3 experimentos.

En resumen, la presencia de PG en el medio de selección de *swim-up* produjo un aumento significativo del porcentaje de recuperación de espermatozoides (Figura 5.1) así como del porcentaje de espermatozoides capacitados (Figura 5.3) respecto del *swim-up* control. Es interesante resaltar que el efecto sobre la capacitación ha sido observado solamente en alguno de los varios eventos que se asocian a este proceso, como el cambio en distribución intracelular de calcio, pero no en otros, como el aumento de fosforilación en residuos de tirosina, probablemente debido al corto periodo de incubación con la hormona, o bien a que sólo actúa a nivel de una ruta molecular y no de todas. Al comparar los resultados obtenidos con ambas concentraciones de hormona, no se observaron diferencias significativas entre la concentración 100 pM y 1  $\mu$ M, lo que sugiere que el receptor de PG podría sufrir un efecto de saturación. Pero tampoco podemos descartar que existan distintos tipos de receptores de PG en el espermatozoide ovino como se ha propuesto en la especie humana. Así, estudios recientes sugieren la existencia de dos tipos de receptores unos de baja afinidad, estimulados a concentración alta de hormona; y otros de alta afinidad, estimulados a concentración más baja de hormona, que mediarían en la activación de diferentes acciones no genómicas (Teves *et al.* 2006).

## 5.2. Influencia de la progesterona en la orientación espermática

En vista de los resultados anteriores, que parecen indicar que la PG atraería a los espermatozoides ovinos capacitados hacia el medio en el que se encuentra, se decidió evaluar su potencial quimiotáctico, es decir, la capacidad de la PG de influir en la direccionalidad de los espermatozoides al ser sometidos a un gradiente de dicha hormona, usando una cámara específicamente diseñada para ello y un programa de análisis de imagen desarrollado por el grupo.

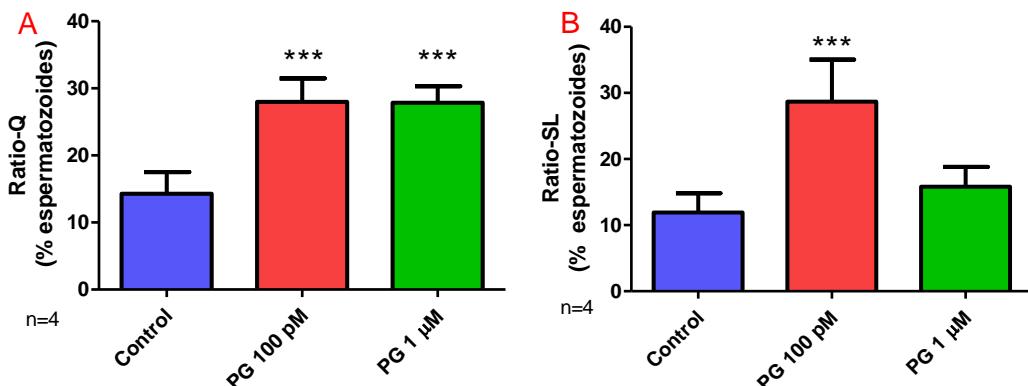
En primer lugar, se evaluó la quimiotaxis en espermatozoides seleccionados y libres de plasma seminal mediante la técnica de *swim-up* estándar explicada anteriormente (*swim-up* control). Como se aprecia en la figura 5.8, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ni en el ratio Q ni en el ratio SL en las muestras sometidas a un gradiente de PG respecto de la muestra control rodeada de un medio sin hormona.



**Figura 5.8.** Análisis de los ratios quimiotácticos Q y SL en espermatozoides procedentes de *swim-up* usando una cámara Dunn en presencia de un medio sin PG (control) o un gradiente de PG formado a partir de una concentración 100 pM o 1  $\mu$ M **A)** Ratio Q. Porcentaje de espermatozoides cuya dirección instantánea en cada *frame* entra dentro del cono quimiotáctico. **B)** Ratio SL. Porcentaje de espermatozoides cuya trayectoria entra dentro del cono quimiotáctico en base a su posición inicial y final únicamente. Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM de 6 experimentos.

Como se ha comentado, el hecho de que en los experimentos anteriores la presencia de PG incrementase el porcentaje de recuperación celular con respecto al *swim-up* control hacía pensar en un posible efecto quimiotáctico que en estos ensayos no se observó. No obstante, es de resaltar que en los ensayos anteriores la muestra fresca era sometida a la acción de la PG durante la hora de duración del *swim-up*, y en este caso, era una muestra ya seleccionada y puesta en contacto con la hormona durante el breve periodo de tiempo del establecimiento del gradiente. Por tanto, se puede concluir que la PG no activa mecanismos de orientación quimiotáctica en una población espermática seleccionada en la que, como habíamos descrito en el apartado anterior, la mayoría de los espermatozoides no estaban capacitados.

Sin embargo, el análisis de quimiotaxis en espermatozoides previamente capacitados *in vitro* (Figura 5.9) sí que reveló la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las muestras sometidas a un gradiente de PG y la muestra control rodeada de un medio sin hormona ( $P<0,001$ ;  $n=4$ ).



**Figura 5.9.** Análisis de los ratios quimiotácticos Q y SL en espermatozoides capacitados *in vitro*, usando una cámara Dunn en presencia de un medio sin PG (control) o un gradiente de PG formado a partir de una concentración 100 pM o 1  $\mu$ M , **A)** Ratio Q. Porcentaje de espermatozoides cuya dirección instantánea en cada *frame* entra dentro del cono quimiotáctico. **B)** Ratio SL. Porcentaje de espermatozoides cuya trayectoria entra dentro del cono quimiotáctico en base a su posición inicial y final únicamente. Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM de 4 experimentos. \*\*\* $P<0,001$  respecto al control.

En el caso de la muestra capacitada expuesta a un gradiente de PG formado a partir de una concentración 100 pM, se observó un aumento significativo tanto en el ratio Q como en el ratio SL con respecto al control ( $P<0,001$ ), lo que indicó la acción de mecanismos quimiotácticos. Los resultados coinciden con lo esperado dado que estudios previos en humano y en conejo han descrito quimiotaxis de espermatozoides en respuesta a un gradiente de PG 100 pM (Teves *et al.* 2006). En cuanto a la muestra capacitada expuesta a un gradiente de PG formado a partir de una concentración 1  $\mu$ M, el ratio Q varió significativamente respecto al control pero, curiosamente, no se evidenciaron diferencias en el ratio SL. Dado que el programa empleado para el análisis de la quimiotaxis todavía está en fase experimental, aún no se ha evaluado qué ratio es de mayor precisión. No obstante, sí que parece existir una capacidad quimioatractante de la PG a concentración 1  $\mu$ M, aunque el hecho de que no esté tan clara como en el caso del gradiente de 100 pM, podría deberse a que una concentración alta de PG produce saturación del receptor y en consecuencia, el espermatozoide pierde parte de su capacidad de respuesta al gradiente de PG.

La PG es una hormona secretada por las células del *cúmulus* que rodean al ovocito (Oren-Benaroya *et al.* 2008), además de estar presente en el fluido oviductal y folicular; y de acuerdo a los resultados obtenidos, podría ser la molécula que actuara como guía de los espermatozoides ovinos hasta el ovocito por medio de mecanismos de orientación quimiotáctica. Además, únicamente los espermatozoides capacitados y por consiguiente con potencial capacidad fecundante, serían capaces de responder a este estímulo. Esta es la primera vez que se describe esta acción quimiotáctica de la PG en espermatozoides ovinos.

## **6. CONCLUSIONES**

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

- La presencia de progesterona a concentración 100 pM y 1 µM en el medio de recogida del método de selección de *swim-up* incrementa de forma significativa el porcentaje de recuperación celular y de espermatozoides ovinos capacitados con respecto al *swim-up* control.
- La presencia de progesterona a concentración 100 pM y 1 µM en el medio de recogida del método de selección de *swim-up* no produce cambios en el porcentaje de espermatozoides mótiles o con membrana íntegra y sin exposición de fosfatidilserina, ni en la distribución del receptor de progesterona en la superficie del espermatozoide ovino.
- La progesterona tanto a dosis bajas (100 pM) como altas (1 µM) 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 progesterone at concentration 100 pM or 1 µM in the upper layer of the selection method *swim-up* increases significantly the cell recovery rate and the percentage of capacitated ram spermatozoa compared to the control *swim-up*.
- The presence of progesterone at concentration 100 pM or 1 µM in the upper layer of the selection method *swim-up* does not cause any changes in the percentage of motile spermatozoa or with membrane integrity and without phosphatidylserine exposure. Likewise, distribution of progesterone receptor in the membrane of ram spermatozoa is not modified in response to this hormone.
- Progesterone can activate chemotaxis in *in vitro* capacitated ram sperm at low (100 pM) and at high (1 µM) concentration.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

- Alvarez, J. G., Lasso, J. L., Blasco, L., Nunez, R. C., Heyner, S., Caballero, P. P. and Storey, B. T. (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.
- Armon, L. and Eisenbach, M. (2011). "Behavioral mechanism during human sperm chemotaxis: involvement of hyperactivation." *PLoS One* **6**(12): e28359.
- Bahat, A. and Eisenbach, M. (2006). "Sperm thermotaxis." *Mol Cell Endocrinol* **252**(1-2): 115-119.
- Baldi, E., Luconi, M., Muratori, M., Marchiani, S., Tamburrino, L. and Forti, G. (2009). "Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions." *Mol Cell Endocrinol* **308**(1-2): 39-46.
- Berger, T., Marrs, R. P. and Moyer, D. L. (1985). "Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa." *Fertil Steril* **43**(2): 268-273.
- Bishop, C. V. and Stormshak, F. (2008). "Non-genomic actions of progesterone and estrogens in regulating reproductive events in domestic animals." *Vet J* **176**(3): 270-280.
- Carson, G. D. and Challis, J. R. (1981). "Maternal steroid changes after fetal death until delivery of the dead sheep fetus." *Can J Physiol Pharmacol* **59**(2): 168-172.
- Colas, C., James, P., Howes, L., Jones, R., Cebrian-Perez, J. A. and Muino-Blanco, T. (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., Gadella, B. M., Voorhout, W. F., Fazeli, A., Bevers, M. M. and Colenbrander, B. (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., Guido, C., Perrotta, I., Avena, P., Panza, S., Ando, S. and Aquila, S. (2011). "Conventional progesterone receptors (PR) B and PRA are expressed in human spermatozoa and may be involved in the pathophysiology of varicocoele: a role for progesterone in metabolism." *Int J Androl* **34**(5 Pt 1): 430-445.
- De Amicis, F., Santoro, M., Guido, C., Sisci, D., Bruno, R., Carpino, A. and Aquila, S. (2012). "Progesterone through progesterone receptors affects survival and metabolism of pig sperm." *Anim Reprod Sci* **135**(1-4): 75-84.
- Gadella, B. M., Tsai, P. S., Boerke, A. and Brewis, I. A. (2008). "Sperm head membrane reorganisation during capacitation." *Int J Dev Biol* **52**(5-6): 473-480.
- Garcia-Alvarez, O., Maroto-Morales, A., Jimenez-Rabadan, P., Ramon, M., del Olmo, E., Iniesta-Cuerda, M., . . . Soler, A. J. (2015). "Effect of different media additives on capacitation of frozen-thawed ram spermatozoa as a potential replacement for estrous sheep serum." *Theriogenology* **84**(6): 948-955.
- García-López, N., Ollero, M., Muñoz-Blanco, T. and Cebrián-Pérez, J. A. (1996). "A dextran *swim-up* procedure for separation of highly motile and viable ram spermatozoa from seminal plasma." *Theriogenology* **46**(1): 141-151.
- Gillan, L., Evans, G. and Maxwell, W. M. (1997). "Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa." *Reprod Fertil Dev* **9**(5): 481-487.
- González-Arto, M., et al., (2013). "Receptores de progesterona y estrogeno  $\beta$  en el espermatozoide ovino y su correlación con la capacitación, in XV Jornadas sobre Producción Animal de la Asociacion Interprofesional para el Desarrollo Agrario (AIDA)".
- Grasa, P., Cebrian-Perez, J. A. and Muino-Blanco, T. (2006). "Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation." *Reproduction* **132**(5): 721-732.

- Guidobaldi, H. A., Teves, M. E., Unates, D. R., Anastasia, A. and Giojalas, L. C. (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., Barratt, C. L. and Publicover, S. J. (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.
- Harrison, R. A. and Vickers, S. E. (1990). "Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa." *J Reprod Fertil* **88**(1): 343-352.
- Isobe, T., Minoura, H., Tanaka, K., Shibahara, T., Hayashi, N. and Toyoda, N. (2002). "The effect of RANTES on human sperm chemotaxis." *Hum Reprod* **17**(6): 1441-1446.
- Jaiswal, B. S., Tur-Kaspa, I., Dor, J., Mashiach, S. and Eisenbach, M. (1999). "Human sperm chemotaxis: is progesterone a chemoattractant?" *Biol Reprod* **60**(6): 1314-1319.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L. and Kirichok, Y. (2011). "Progesterone activates the principal Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm." *Nature* **471**(7338): 387-391.
- Marti, E., Perez-Pe, R., Colas, C., Muino-Blanco, T. and Cebrian-Perez, J. A. (2008). "Study of apoptosis-related markers in ram spermatozoa." *Anim Reprod Sci* **106**(1-2): 113-132.
- Miki, K. and Clapham, D. E. (2013). "Rheotaxis guides mammalian sperm." *Curr Biol* **23**(6): 443-452.
- Neild, D. N., Gadella, B. M., Aguero, A., Stout, T. A. and Colenbrander, B. (2005). "Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm." *Anim Reprod Sci* **89**(1-4): 47-56.
- Ollero, M., Muino-Blanco, T., Lopez-Perez, M. J. and Cebrian-Perez, J. A. (1996). "Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations." *Int J Androl* **19**(5): 287-292.
- Oren-Benaroya, R., Orvieto, R., Gakamsky, A., Pinchasov, M. and Eisenbach, M. (2008). "The sperm chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone." *Hum Reprod* **23**(10): 2339-2345.
- Perez-Cerezales, S., Boryshpolets, S. and Eisenbach, M. (2015). "Behavioral mechanisms of mammalian sperm guidance." *Asian J Androl* **17**(4): 628-632.
- Rago, V., Giordano, F., Brunelli, E., Zito, D., Aquila, S. and Carpino, A. (2014). "Identification of G protein-coupled estrogen receptor in human and pig spermatozoa." *J Anat* **224**(6): 732-736.
- Roldan, E. R., Murase, T. and Shi, Q. X. (1994). "Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida." *Science* **266**(5190): 1578-1581.
- Romarowski, A., Sanchez-Cardenas, C., Ramirez-Gomez, H. V., Puga Molina Ldel, C., Trevino, C. L., Hernandez-Cruz, A., . . . Buffone, M. G. (2016). "A Specific Transitory Increase in Intracellular Calcium Induced by Progesterone Promotes Acrosomal Exocytosis in Mouse Sperm." *Biol Reprod* **94**(3): 63.
- Sagare-Patil, V., Galvankar, M., Satiya, M., Bhandari, B., Gupta, S. K. and 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**(5): 633-644.
- Sirivaidyapong, S., Bevers, M. M., Gadella, B. M. and Colenbrander, B. (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., Barbano, F., Guidobaldi, H. A., Sanchez, R., Miska, W. and Giojalas, L. C. (2006). "Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa." *Fertil Steril* **86**(3): 745-749.
- Therien, I. and Manjunath, P. (2003). "Effect of progesterone on bovine sperm capacitation and acrosome reaction." *Biol Reprod* **69**(4): 1408-1415.

- Wang, Y., Storeng, R., Dale, P. O., Abyholm, T. and Tanbo, T. (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 Storey, B. T. (1984). "Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay." *Dev Biol* **104**(2): 287-296.
- Witte, T. S. and Schafer-Somi, S. (2007). "Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa." *Anim Reprod Sci* **102**(3-4): 181-193.
- Wu, J. T., Chiang, K. C. and Cheng, F. P. (2006). "Expression of progesterone receptor(s) during capacitation and incidence of acrosome reaction induced by progesterone and zona proteins in boar spermatozoa." *Anim Reprod Sci* **93**(1-2): 34-45.
- Zamir, N., Riven-Kreitman, R., Manor, M., Makler, A., Blumberg, S., Ralt, D. and Eisenbach, M. (1993). "Atrial natriuretic peptide attracts human spermatozoa in vitro." *Biochem Biophys Res Commun* **197**(1): 116-122.

## **8. ANEXOS**

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

### **The inclusion of progesterone in the dextran/swim-up procedure increases the recovery of ram capacitated sperm rate**

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

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA). Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza, Spain.*

The presence of receptors for progesterone (P4) on the mammal sperm surface, leads to speculate about a relevant role of this hormone on sperm functionality. However, the information about their specific effects on ovine spermatozoa is scarce. In this study we used a ram sperm washing and selecting-procedure, a dextran/swim-up method, including two different concentrations of progesterone in the upper layer, one low (100 pM, LPsw) and one high (1 µM, HPsw). We compared cell recovery and sperm quality with the standard swim-up obtained sample (STsw, with no hormone). Both P4 concentrations resulted in a significantly higher cell recovery rate (RR: 52.3±4.8 and 53.4±5.8% for LPsw and HPsw, respectively) and percentage of capacitated sperm (CTC: 35.0±6.2 and 38.0±5.8 for LPsw and HPsw, respectively) than STsw (42.5±3.7 and 26.6±6.7% for RR and CTC, respectively; P<0.05). However, the inclusion of P4 showed no effect on motility (by CASA), membrane integrity (CFDA+/PI-) or phosphatidylserine exposure (Annexin-). Indirect immunofluorescence assays are currently in progress in order to determine whether there are changes in P4 receptor distribution in the sperm subpopulation selected by LPsw and HPsw, compared with STsw.

**Grants: CICYT AGL 2014-57863-R and DGA 2015-A26 FSE**



**ESDAR**  
European Society  
for Domestic Animal Reproduction

**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](#)

## 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

#### The inclusion of progesterone in the dextran/swim-up procedure increases the recovery of ram capacitated sperm rate

R. Perez-Pe<sup>1</sup>, P. Nadal<sup>2</sup>, J. Peinado<sup>2</sup>, S. Gimeno<sup>2</sup>, A. Casao<sup>2</sup>, J. Cebrian-Perez<sup>2</sup> and T. Muiño-Blanco<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dpt. Biochemistry. F. Veterinary. University of Zaragoza, <sup>2</sup>Dpto. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCa). Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza

The presence of receptors for progesterone (P4) on the mammal sperm surface, leads to speculate about a relevant role of this hormone on sperm functionality. However, the information about their specific effects on ovine spermatozoa is scarce. In this study we used a ram sperm washing and selecting-procedure, a dextran/swim-up method, including two different concentrations of progesterone in the upper layer, one low (100 pM, LPsw) and one high (1 μM, HPsw). We compared cell recovery and sperm quality with the standard swim-up obtained sample (STsw, with no hormone). Both P4 concentrations resulted in a significantly higher cell recovery rate (RR: 52.3±4.8 and 53.4±5.8% for LPsw and HPsw, respectively) and percentage of capacitated sperm (CTC: 35.0±6.2 and 38.0±5.8 for LPsw and HPsw, respectively) than STsw (42.5±3.7 and 26.6±6.7% for RR and CTC, respectively; P<0.05). However, the inclusion of P4 showed no effect on motility (by CASA), membrane integrity (CFDA+PI-) or phosphatidylserine exposure (Annexin-). Indirect immunofluorescence assays are currently in progress in order to determine whether there are changes in P4 receptor distribution in the sperm subpopulation selected by LPsw and HPsw, compared with STsw. Grants: CICYT AGL 2014-57863-R and DGA 2015-A26 FSE