



Efecto de agonistas y antagonistas de los receptores de progesterona sobre la capacitación y movimiento de los espermatozoides ovinos

Autor/es

María José Santorromán Nuez

Director/es

**Dr. Rosaura Pérez Pé
Dr. M^aTeresa Muiño Blanco**

Grupo Biología y Biotecnología de la Reproducción
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de
Veterinaria
Noviembre 2017

Los resultados derivados del presente Trabajo Fin de Grado han sido presentados al siguiente congreso (Anexos):

Título: *Progesterone-induce changes in the ram sperm acrosome reaction are inhibited by the antagonist mifepristone*

Autores: **M.J. Santorromán**, S. Gimeno-Martos, A. Casao, J.A. Cebrián-Pérez, T. Muiño-Blanco, R. Pérez-Pé

XXXII Congreso AETE (Asociación Europea de Tecnología Embriolaria), Bath (Inglaterra)
Septiembre 2015





La Dra. Rosaura Pérez Pe, Profesora Titular, y la Dra. M^a Teresa Muiño Blanco, Catedrática, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza

INFORMAN:

Que la alumna María José Santorromán Nuez, ha realizado bajo nuestra dirección, en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, su Trabajo Fin de Grado titulado *Efecto de agonistas y antagonistas de los receptores de progesterona sobre la capacitación y movimiento de los espermatozoides ovinos*. 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 21 de noviembre de 2017.



Rosaura Pérez Pé



M^aTeresa Muiño Blanco

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi grupo de investigación la posibilidad que me han dado de poder realizar este trabajo con ellos, ya que ni siquiera me conocían cuando aceptaron mi propuesta.

En primer lugar, dar las gracias a Rosaura Pérez y M^a Teresa Muiño por dirigir este gran trabajo y estar siempre dispuestas a ayudarme en cualquier dificultad.

Quiero dar mil gracias a Silvia Gimeno, ya que gracias a ella he aprendido todas las técnicas necesarias para la experimentación llevada a cabo en este trabajo, además de ser un apoyo incondicional a lo largo de éste.

También agradecer tanto a Adriana como a Carlos toda la ayuda prestada en todo momento, resaltando los conocimientos transmitidos en aspectos estadísticos e informáticos.

También agradecer a Pepín esa alegría transmitida que mejoraba diariamente el ambiente de trabajo.

Muchas gracias a todos los miembros que componen el grupo (Sara, Melissa, y compañeros de TFG y TFM) que siempre han estado allí en cada momento que los he necesitado.

Ha sido un gran placer compartir esta experiencia con este grupo. Sólo puedo decir Gracias.

CONTENIDO

1. RESUMEN	6
ABSTRACT	6
2. INTRODUCCIÓN.....	7
2.1 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA	7
2.1.1 Eventos fisiológicos y bioquímicos de la capacitación.....	7
2.1.2 Moléculas y segundos mensajeros implicados en la capacitación.....	8
2.2 EFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE EL ESPERMATOZOIDE	10
2.3 TANAPROGET, UN AGONISTA DE RECEPTORES DE PROGESTERONA	10
2.4 MIFEPRISTONA, UN ANTAGONISTA DE RECEPTORES DE PROGESTERONA	11
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1 PROCESADO DE LAS MUESTRAS	12
4.1.1 Obtención del semen	12
4.1.2 Método <i>swim-up/dextrano</i>	13
4.1.3 Capacitación <i>in vitro</i>	13
4.2 EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS.....	14
4.2.1 Concentración espermática	14
4.2.2 Viabilidad celular	14
4.2.3 Motilidad espermática	15
4.2.4 Evaluación del estado de capacitación	16
4.2.5 Análisis de la translocación de fosfatidilserina en la membrana espermática	16
4.2.6 Detección de la fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas de membrana espermáticas por western blotting.....	17
4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	18
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
5.1 EFECTO DE LA PRESENCIA DE UN AGONISTA DE LOS RECEPTORES DE PROGESTERONA, EL TANAPROGET, SOBRE ESPERMATOZOIDES OVINOS INCUBADOS EN CONDICIONES CAPACITANTES	18
5.1.1 Efecto del tanaproget sobre la motilidad espermática	18
5.1.2 Efecto del tanaproget sobre la integridad de membrana.....	19
5.1.3 Efecto del tanaproget sobre la distribución intracelular del calcio	19
5.1.4 Efecto del tanaproget sobre la fosforilación en residuos de tirosinas de las proteínas de membrana espermáticas	20
5.1.5 Efecto del tanaproget sobre la translocación de fosfatidilserina(fs) en la membrana espermática.....	21

5.2. EFECTO DE LA PRESENCIA DE UN ANTAGONISTA DE RECEPTORES DE PROGESTERONA, LA MIFEPRISTONA, SOBRE LA ACCIÓN DE LA P4 EN ESPERMATOZOIDES OVINOS INCUBADOS EN CONDICIONES CAPACITANTES	22
5.2.1 Efecto de la mifepristona sobre la acción de la p4 en la motilidad espermática	22
5.2.2 Efecto de la mifepristona sobre la acción de la p4 en la integridad de membrana.....	23
5.2.3 Efecto de la mifepristona sobre la acción de la p4 en la distribución intracelular del calcio	24
5.2.4 Efecto de la mifepristona sobre la acción de la p4 en la fosforilación en residuos de tirosinas de las proteínas de membrana espermáticas	25
5.2.5 Efecto de la mifepristona sobre la acción de la p4 en la translocación de fosfatidilsérina(fs) en la membrana espermática.....	25
6. CONCLUSIONES.....	26
7. BIBLIOGRAFÍA	26
8. ANEXOS	31

1. RESUMEN

La progesterona (P4) es una hormona fundamental en la reproducción de los mamíferos, y se ha referido que podría regular la funcionalidad espermática, particularmente la capacitación, por medio de rápidas acciones no genómicas ya que se haya presente en el tracto reproductor femenino y los espermatozoides presentan receptores para esta hormona. La capacitación es un proceso que engloba el conjunto de cambios que debe sufrir el espermatozoide en el tracto reproductor femenino para adquirir la capacidad fecundante. Existen moléculas sintéticas conocidas como moduladores selectivos de los receptores de progesterona (PR), que pueden ejercer acciones como agonistas o antagonistas de los PRs, y que se utilizan en tratamientos terapéuticos, como anticonceptivos o como abortivos. El objetivo principal de este trabajo consistió en analizar el efecto de la progesterona, así como de un agonista de los receptores de P4 (tanaproget) y de antagonista de los mismos (mifepristona), en la funcionalidad de espermatozoides ovinos.

Para ello, las muestras espermáticas se incubaron en un medio formulado para capacitar espermatozoides ovinos *in vitro* (*cocktail*) en presencia de 1 μ M de P4, de dos concentraciones de tanaproget (1 μ M y 5 μ M), o de dos concentraciones de mifepristona (4 μ M y 40 μ M), en este último caso, previamente a la adición de P4. Los parámetros de funcionalidad espermática analizados fueron motilidad, viabilidad, estado de capacitación, niveles de fosforilación en residuos de tirosina de las proteínas espermáticas y translocación de fosfatidilserina (FS).

Los resultados obtenidos indican que tanto la P4 como el agonista de PR, el tanaproget, a ambas concentraciones ensayadas produjeron un incremento en el porcentaje de espermatozoides que experimentaron la reacción acrosómica, así como los que presentaron translocación de FS, y una disminución de la motilidad progresiva, efectos, todos ellos, consecuencia del proceso de capacitación espermática. El antagonista de PRs, la mifepristona, bloqueó el efecto de la progesterona disminuyendo el porcentaje de espermatozoides que sufrieron la reacción acrosómica, así como el de los que presentaron translocación de FS, manteniendo la motilidad progresiva.

ABSTRACT

Progesterone (P4) is a fundamental hormone in the reproduction of mammals. Given that P4 is present in the female reproductive tract, and that spermatozoa present receptors for this hormone, P4 might regulate sperm functionality, particularly capacitation, through rapid non-genomic actions. Capacitation is a process that includes the set of changes that sperm must experience in the female reproductive tract to acquire the fertilizing capacity. There are synthetic molecules known as selective modulators of progesterone receptors (PR), which can act as agonists or antagonists of the PRs that are used in therapeutic treatments as contraceptives or abortifacients. The main aim of this work has been to analyze the effect of progesterone as well as an agonist of the P4 receptors (tanaproget) and their antagonist (mifepristone) on the functionality of ovine sperm.

For this purpose, sperm samples were incubated in a medium (*cocktail*) formulated to capacitate ram spermatozoa *in vitro* in the presence of 1 μM P4, 1 μM and 5 μM tanaproget, or 4 μM and 40 μM mifepristone (this last one was added previously to the addition of P4). The sperm functionality parameters analyzed were motility, viability, state of capacitation, phosphorylation levels in tyrosine residues of membrane sperm proteins and translocation of phosphatidylserine (FS).

The results obtained indicated that both the P4 and the PR agonist, tanaproget at both concentrations tested, produced an increase in the percentage of sperm that experienced the acrosome reaction, as well as those that had translocation of FS, and a decrease in progressive motility, effects, all of them, consequence of the sperm capacitation process. The antagonist of PRs, mifepristone, blocked the effect of P4, decreasing the percentage of spermatozoa that suffered the acrosome reaction, as well as that of those that presented SF translocation and maintaining progressive motility.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

El espermatozoide de los mamíferos es incapaz de fecundar el ovocito tras la eyaculación. La capacidad fecundante la adquiere durante su tránsito por el tracto reproductor femenino, en un proceso conocido como capacitación espermática, que implica una serie secuencial de profundos cambios bioquímicos y biofísicos ¹.

2.1.1 EVENTOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE LA CAPACITACIÓN

2.1.1.1 INCREMENTO EN LA FLUIDEZ DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Durante la capacitación, el colesterol se reordena en la parte apical de la cabeza espermática, recolocación que se produce de forma previa a su eliminación. Moléculas como la albúmina sérica bovina (BSA), lipoproteínas de alta densidad (HDL) y β -ciclodextrinas se han descrito como promotoras de la capacitación espermática, actuando como aceptores del colesterol y eliminándolo de la membrana plasmática ².

2.1.1.2 HIPERACTIVACIÓN FLAGELAR

Se trata de un cambio en el patrón de la motilidad necesario para la fecundación ³ producido por cambios conformacionales en las proteínas del axonema del flagelo, proporcionándole mayor flexibilidad. El espermatozoide de mamífero presenta dos tipos de motilidad fisiológica: una motilidad activada, propia del espermatozoide recién eyaculado, y una motilidad hiperactivada, característica de espermatozoides con capacidad fecundante ³. La motilidad activada se caracteriza por una trayectoria del espermatozoide en línea relativamente recta. Sin embargo, una vez hiperactivado, el patrón de movimiento cambia; normalmente aumenta el desplazamiento lateral de la cabeza y los flagelos producen curvas más profundas ¹ adquiriendo un movimiento de penetración, lo que le permite de manera fisiológica buscar al ovocito para fecundarlo. Durante este proceso, la frecuencia de batido del flagelo se reduce en torno a un sexto.

2.1.1.3 FOSFORILACIÓN DE PROTEINAS EN RESIDUOS DE TIROSINA

La fosforilación en tirosinas fue descrita en la célula espermática por primera vez en 1989⁴ identificándose tres proteínas fosforiladas de 52, 75 y 95 KDa gracias al uso de anticuerpos anti-fosfotirosinas. Esta fosforilación aumenta durante la capacitación en diversas especies y parece ser un prerequisito para que el espermatozoide pueda fecundar al ovocito⁵. En el caso de los espermatozoides ovinos, este hecho fue descrito por primera vez por nuestro grupo de investigación⁶ que más recientemente demostró la participación de nuevas vías alternativas de señalización que regulan este proceso⁷ además de la clásica AMPc/PKA⁸ de la que se hablará más adelante. Además de la fosforilación en tirosinas, también se ha observado que durante la capacitación se produce un incremento de fosforilación en residuos de serinas y treoninas, tanto en ovino⁹ como en otras especies como humano¹⁰ o ratón¹¹.

2.1.1.4 PREPARACIÓN PARA EXPERIMENTAR LA REACCIÓN ACROSÓMICA

La reacción acrosómica (RA) es un proceso de exocitosis que ayuda al espermatozoide a penetrar la zona pelúcida del ovocito y le permite por tanto llevar a cabo la fecundación. Solo aquellos espermatozoides capacitados son capaces de experimentar la RA en el tracto reproductor femenino¹². Tanto la entrada de Ca²⁺, como la producción de especies reactivas de oxígeno, el aumento de la actividad del AMPc (que se verá más adelante) y la fosforilación en residuos de tirosina de proteínas intervienen en la inducción de la RA^{1,13,14}.

2.1.1.5 APOPTOSIS

Uno de los factores que favorecen la capacitación espermática, es el cambio en la concentración del ión bicarbonato, activando una serie de cambios en la arquitectura de la membrana, permitiendo que se externalice la fosfatidilserina (PS)¹⁵. Sin embargo, este mismo evento ocurre también en células apoptóticas de diversos tipos celulares¹⁶, incluyendo el espermatozoide¹⁷. Se ha visto que horas después de haber terminado la capacitación, el espermatozoide presenta marcadores apoptóticos como son ruptura de doble cadena del ADN, mal funcionamiento mitocondrial, activación de caspasas y externalización de PS¹⁷. Nuestro grupo de investigación ha demostrado muy recientemente que la vía metabólica implicada en la capacitación espermática es común con la involucrada en la apoptosis, siendo la capacitación del espermatozoide un paso previo de la apoptosis¹⁸.

2.1.2 MOLÉCULAS Y SEGUNDOS MENSAJEROS IMPLICADOS EN LA CAPACITACIÓN

2.1.2.1 BICARBONATO

La capacitación es un proceso dependiente del ión HCO³⁻¹⁵. De hecho, se hipotetiza que las bajas concentraciones de bicarbonato en el epidídimo mantienen a los espermatozoides sin capacitar hasta que los altos niveles de este anión en el tracto reproductor femenino disparan su capacitación¹⁹. Este transporte de HCO³⁻ a través de la membrana puede ser el responsable del incremento del pH intracelular que se observa durante la capacitación²⁰. Este incremento de HCO³⁻ va a afectar principalmente a la membrana espermática. En determinadas circunstancias, la asimetría transversal de la membrana plasmática se altera dando lugar a un fenómeno conocido como *scrambling* (desestabilización), y que lleva asociado la externalización de determinados fosfolípidos que en

condiciones normales se hallan en la cara interna de la misma. Este ión, por tanto, modifica la estructura lipídica de la membrana plasmática del espermatozoide durante la capacitación, lo que lleva a su desestabilización y permite que la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide pueda fusionarse a la membrana acrosomal en la reacción acrosómica, y, posteriormente, con la membrana del ovocito²¹.

2.1.2.2 CALCIO

En la mayoría de las especies se ha observado un incremento de calcio intracelular durante la capacitación²²⁻²⁴. Este incremento puede ser debido a la entrada de calcio desde el exterior o a la salida del mismo desde reservorios intracelulares. Sin embargo, también se ha observado una disminución de la calmodulina (proteína de unión al Ca²⁺) durante la capacitación espermática, por lo que también se mantendrían altos los niveles de Ca²⁺ intracelular gracias a esta vía²⁵. La entrada de calcio desde el exterior puede deberse tanto a la apertura de canales permeables al mismo, como al incremento de la fluidez de la membrana plasmática que se produce durante este proceso, gracias a la salida del colesterol comentada anteriormente²⁶. Sin embargo, existen controversias sobre el papel del calcio extracelular en la capacitación espermática^{27,28}.

2.1.2.3 ACEPTORES DE COLESTEROL

Se ha comprobado que, para la mayoría de las especies, los medios para llevar a cabo la capacitación *in vitro* deben incluir albúmina sérica bovina (BSA), debido a que este compuesto es capaz de retirar el colesterol de las membranas, aumentando por tanto su fluidez. Este papel, *in vivo* lo desempeñarían, además de la albúmina, abundante en los fluidos oviductal y uterino, otras proteínas de unión a esteroles como las lipoproteínas de alta densidad (HDLs). Otro compuesto utilizado en los medios de capacitación con el mismo objetivo son las β-ciclodextrinas. Las β-ciclodextrinas presentan una elevada afinidad y especificidad por los esteroles y son capaces de eliminar más del 80% del colesterol de membrana de las células^{29,30}.

2.1.2.4 ADENOSIN MONOFOSFATO CÍCLICO (AMPc)

El aumento de la concentración de AMPc durante la capacitación parece ser mayoritariamente dependiente de un aumento en la concentración de HCO³⁻ y, en algunas especies, de Ca²⁺, ya que ambos iones estimulan la adenilatoclasa soluble (ACs). Esto a su vez, estimula la protein-kinasa A (PKA) para fosforilar, entre otros, residuos de tirosina de ciertas proteínas^{19,31}. De esta manera, al utilizar un inhibidor de la PKA o un antagonista de AMPc se ven alterados los procesos de capacitación y la fosforilación de tirosinas³². En cuanto al papel que desempeña el incremento de AMPc en otros aspectos relacionados con la capacitación, como la hiperactivación, existe cierta controversia^{1,23}.

Estudios de nuestro grupo sugieren que los elevados niveles intracelulares de fosfodiesterasas (PDEs, enzimas encargadas de la degradación del AMPc) presentes en el espermatozoide ovino serían los responsables del bajo contenido de AMPc intracelular observado^{8,33}. Asimismo, se demostró que era necesario mantener altos niveles intracelulares de AMPc para la inducción de la capacitación *in vitro* de espermatozoides ovinos⁸, aunque la tradicional vía dependiente de AMPc/PKA está sólo parcialmente implicada en este proceso. Estudios recientes han mostrado que existen otras rutas de señalización celular que participan en la regulación del proceso de capacitación en esta especie⁷. En

este trabajo, la capacitación *in vitro* se indujo con un medio que mantiene altos niveles de AMPc al que nos referiremos como *cocktail*⁸.

2.2 EFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE EL ESPERMATOZOIDE

La progesterona es una hormona esteroidea que juega un papel fundamental en la regulación de los procesos reproductivos de los mamíferos. Su acción en las hembras ha sido muy estudiada, en cambio en los machos ha sido en los últimos años cuando se ha descubierto que también desempeña un rol importante en la fertilidad. Se ha postulado que la P4 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 presente³⁴. La forma en la que la P4 ejerce estas rápidas acciones no-genómicas sobre los espermatozoides es todavía materia de discusión, pudiendo 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 específicos³⁴. En la especie ovina, nuestro grupo de investigación ha evidenciado recientemente la presencia de receptores de PG en la membrana espermática. Diferentes estudios sugieren que la P4 provoca la activación de diferentes rutas de señalización intracelular implicadas en los procesos propios de la capacitación. Entre ellos se encuentra la generación de AMP cíclico, la fosforilación de residuos de tirosinas, la activación de fosfolipasas y el incremento del Ca²⁺ intracelular, aunque no esté claro el mecanismo de acción³⁴. El espermatozoide necesita poseer una motilidad progresiva a lo largo del tracto reproductor femenino para poder llegar hasta el ovocito. Se ha descrito que la incubación de espermatozoides capacitados *in vitro* con P4 a concentraciones 5-10 µM provoca un aumento de la motilidad progresiva a tiempos cortos³⁵. Igualmente, la P4 influye en el metabolismo del espermatozoide que le aporta la energía necesaria para llegar al ovocito ya que modula la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enzima limitante de la ruta de las pentosas fosfato³⁶. En cuanto a la capacitación espermática, se ha descrito que la P4 estimula la capacitación en la especie humana³⁴ y el patrón de movimiento asociado a la capacitación (hiperactivación) a concentraciones entre 3 y 5 µM tanto en ratón³⁷ como en la especie humana³⁵. Además, diferentes estudios han mostrado que la PG 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^{38,39}.

2.3 TANAPROGET, UN AGONISTA DE RECEPTORES de PROGESTERONA

El tanaproget (NSP-989) es una progestina no esteroidea, la cual presenta alta afinidad, eficacia y selectividad de unión a los receptores de P4⁴⁰. Este compuesto es capaz de inducir una disminución del AMPc produciendo una reducción significativa de las lesiones con endometriosis tanto en ratones como en humanos⁴¹. Además, en los últimos estudios se ha visto que el tanaproget tiene un perfil farmacocinético aceptable para su uso como anticonceptivo oral una vez al día, aunque presenta algunos efectos secundarios leves como la disminución del moco cervical⁴².

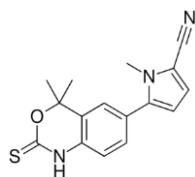


Figura 2.1: Estructura molecular del tanaproget, un agonista de los receptores de progesterona.

No se han realizado estudios sobre los posibles efectos del tanaproget sobre los espermatozoides de ninguna especie.

2.4 MIFEPRISTONA, UN ANTAGONISTA DE RECEPTORES DE PROGESTERONA

La mifepristona (RU-486) es un compuesto sintético esteroideo usado como medicamento con propiedades antiprogestágenas y antiglucocorticoides. Es un antagonista de los receptores de progesterona utilizado como medicamento abortivo en la interrupción voluntaria del embarazo entre las primeras 7 a 9 semanas (49 a 63 días). La mifepristona también se utiliza para tratar tumores cerebrales, endometriosis⁴³, y para inducir el parto en mujeres embarazadas⁴⁴.

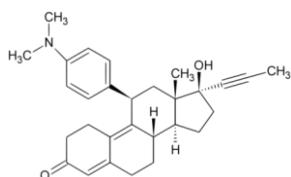


Figura 2.2: Estructura molecular de la mifepristona, un antagonista de los receptores de progesterona.

En presencia de P4, la mifepristona actúa como un antagonista del receptor de progesterona competitivo. Posee un sustituyente p-(dimetilamino)fenilo voluminoso por encima del plano de la molécula, en posición 11β, responsable de inducir o stabilizar una conformación del receptor inactiva, y un sustituyente propinil hidrofóbico debajo del plano de la molécula, en posición 17α, que incrementa su afinidad por el receptor de progesterona⁴⁵. Además de ser un antiprogestágeno, la mifepristona también es un antiglucocorticoide y un antiandrógeno débil⁴⁶. La afinidad relativa de la mifepristona por el receptor de P4 es más del doble que la afinidad de la propia P4⁴⁵. Clínicamente se usa para:

- Terminación médica de embarazos intrauterinos de hasta 49 días de gestación (hasta 63 días de gestación en Gran Bretaña y Suecia)⁴³
- Ablandomiento y dilatación del cuello uterino antes de la dilatación cervical mecánica para la terminación del embarazo⁴⁷.
- En combinación con gemeprost (estructura análoga de prostaglandina) para la terminación de embarazos de entre 13 a 24 semanas de gestación^{47,48}.
- Inducción del parto en la muerte fetal en útero⁴⁹.

A diferentes concentraciones, el efecto producido por la mifepristona tanto a nivel físico como fisiológico en el aparato reproductor femenino cambia, utilizándose como un anticonceptivo regular a dosis de 2 mg al día evitando la ovulación (1 mg al día no lo hace)⁵⁰; una única dosis de 10 mg

preovulatoria de mifepristona retarda la ovulación por 3 a 4 días y es tan efectiva como un anticonceptivo de emergencia; y a dosis mayores o iguales a 1 mg/kg antagoniza los efectos endometriales y miometriales de la P4⁵⁰. En espermatozoides humano la mifepristona modula sus funciones actuando como antagonista de la progesterona suprimiendo de forma dosis-dependiente la reacción acrosómica inducida por progesterona, la hiperactivación en concentraciones $\geq 0.4 \mu\text{M}$ en espermatozoides humanos⁵¹.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La progesterona (P4) es una hormona fundamental en la reproducción de los mamíferos, y se ha descrito que podría regular la funcionalidad espermática, particularmente la capacitación, por medio de rápidas acciones no genómicas ya que se haya presente en el tracto reproductor femenino y los espermatozoides presentan receptores para esta hormona.

En base a ello, nos planteamos la **hipótesis de que la progesterona juega un papel importante en la funcionalidad espermática, especialmente en el proceso de capacitación, y que actúa a través de su unión a receptores específicos en la membrana del espermatozoide.**

Por tanto, el **objetivo general** de este trabajo consistió en estudiar el efecto de la P4, así como el de un agonista y un antagonista de los receptores de P4, sobre la capacitación espermática y otros parámetros de funcionalidad espermática en la especie ovina.

Para ello, los **objetivos específicos** planteados fueron:

1. Analizar el efecto de la progesterona sobre la motilidad, viabilidad, distribución intracelular del calcio, fosforilación en residuos de tirosina de proteínas de la membrana espermática, y translocación de fosfatidilserina a la cara externa de la misma.
2. Estudiar el efecto de un agonista de los receptores de progesterona, el tanaproget, sobre esos mismos parámetros
3. Estudiar el efecto de la incubación previa con un antagonista de los receptores de progesterona, la mifepristona, sobre las acciones que ejerce dicha hormona.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 PROCESADO DE LAS MUESTRAS

4.1.1 OBTENCIÓN DEL SEMEN

En los experimentos realizados se utilizó semen ovino obtenido a partir de moruecos adultos (de entre 3 y 6 años), pertenecientes a la Asociación Nacional de Ganaderos de la raza Rasa Aragonesa (ANGRA), mantenidos en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la

Universidad de Zaragoza. Tanto el mantenimiento de los sementales como la obtención de las muestras corrieron a cargo del personal del SEA. Los animales se mantuvieron con un régimen de tres extracciones semanales, manteniéndose así períodos de abstinencia de dos o tres días. Se obtuvieron dos eyaculados consecutivos por morueco, mediante vagina artificial, y se utilizaron sólo los segundos en base a resultados previos de nuestro equipo de investigación que demostraron que éstos tenían mejores parámetros de calidad seminal⁵². Tras la recogida, las muestras se mantuvieron a 37 °C hasta su uso y se trabajó con la mezcla de los segundos eyaculados para evitar diferencias individuales.

4.1.2 METODO SWIM-UP/DEXTRANO

Con el fin de eliminar el plasma seminal y/o restos celulares de los eyaculados, se utilizó el método de *swim-up/dextrano*. La eliminación del plasma seminal resulta conveniente debido al efecto perjudicial que éste ejerce en el mantenimiento de las células espermáticas⁵³, así como para evitar la influencia de sus componentes en los resultados obtenidos. El método de *swim-up/dextrano* puesto a punto en nuestro laboratorio por García- López y col.⁵⁴ está basado en el descrito por Álvarez para espermatozoides humanos⁵⁵, pero se modificaron tanto alguno de los pasos del proceso como la composición del medio para su aplicación en el lavado de espermatozoides ovinos. El medio utilizado fue el MS, compuesto por NaCl 50 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 0,4 mM, KHPO₄ 0,3 mM, HEPES 21 mM, glucosa 2,8 mM, piruvato sódico 0,33 mM, lactato sódico 18,6 mM, sacarosa 200 mM, pH 6,5. Al medio se le añadieron 1,5 UI/ml de penicilina y 15 µg/ml de estreptomicina para evitar su contaminación. Este medio no contenía ni CaCl₂ ni NaHCO₃ para evitar una capacitación prematura de las células⁵⁶.

Para la realización del *swim-up* se pipetaron cuidadosamente 500 µl de semen en el fondo de un tubo redondeado de 15 mm de diámetro. Sobre el semen se depositaron 500 µl de MS-Dx (30 mg dextrano/ml MS) y a continuación, muy lentamente se añadieron 1,5 ml de MS-A (5 mg albúmina sérica bovina/ml MS). Pasados 15 minutos a 37 °C, se recogieron 750 µl del sobrenadante. El proceso se repitió otras tres veces consecutivas, obteniéndose un total de cuatro sobrenadantes. Se desechó el primer sobrenadante por contener restos del plasma seminal, y se trabajó posteriormente con la mezcla de los tres restantes. Esta técnica no es un simple método de lavado, ya que presenta la doble ventaja de obtener una población espermática libre de plasma seminal, al tiempo que está enriquecida en espermatozoides altamente mótiles y viables⁵⁴.

4.1.3 CAPACITACIÓN IN VITRO

Para inducir la capacitación espermática *in vitro*, a partir de las muestras previamente seleccionadas mediante *swim-up*, se introdujeron alícuotas de 1,6 x 10⁸ cels./ml en una estufa de incubación a 39 °C, con 5% de CO₂ y 100% de humedad, durante 3 horas. Las incubaciones se llevaron a cabo en medio TALP completo⁵⁷, compuesto por NaCl 100 mM, KCl 3,1 mM, NaHCO₃ 25 mM, NaH₂PO₄ 0,3 mM, lactato sódico 21,6 mM, CaCl₂ 3 mM, MgCl₂ 0,4 mM, HEPES 10 mM, piruvato sódico 1 mM y glucosa 5 mM; se añadieron 5 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA), y se ajustó su pH a 7,2. Además, a todas las alícuotas excepto a la muestra control, se les añadió una mezcla de sustancias al medio TALP, con probada capacidad para inducir la capacitación *in vitro* de los espermatozoides ovinos⁸, y que se denominará *cocktail* a lo largo de la presente memoria. El *cocktail* estaba compuesto por dibutiril-cAMP (un análogo del AMPc; 1 mM), cafeína y teofilina (ambos inhibidores de

fosfodiesteras; 1 mM, cada uno), ácido okadaico (un inhibidor de fosfatases de amplio espectro; 0,2 µM) y metil-β-ciclodextrinas (2,5 mM).

Tanto la progesterona (P4) como el antagonista (mifepristona) y el agonista (tanaproget) de los receptores de P4 utilizados en los experimentos se disolvieron en PBS con dimetilsulfóxido (DMSO) hasta unas concentraciones finales de 1 µM de P4; 4 µM y 40 µM del antagonista incubado 1 hora añadiéndole posteriormente P4 1 µM y 1 µM y 5 µM del agonista. La concentración final de DMSO en todas las muestras fue de 0,1%, incluidas las muestras control.

La nomenclatura que se seguirá a lo largo de todo el trabajo será: *swim-up* (sup) (muestra libre de plasma seminal sin incubar en condiciones capacitantes), control (incubada en medio TALP), *cocktail* (medio TALP + sustancias elevadoras del AMPc), P4 1 µM (medio TALP + sustancias elevadoras del AMPc + 1 µM de progesterona), Mif 40 µM (medio TALP + sustancias elevadoras del AMPc + 40 µM de mifepristona + 1 µM de progesterona), Mif 4 µM (medio TALP + sustancias elevadoras del AMPc + 4 µM de mifepristona + 1 µM de progesterona), Tan 5 µM (medio TALP + sustancias elevadoras del AMPc + 5 µM de tanaproget) y Tan 1 µM (medio TALP + sustancias elevadoras del AMPc + 1 µM de tanaproget). La cantidad de medio TALP añadido a cada una de las alícuotas dependió de la cantidad de muestra de *swim-up* necesaria para tener la adecuada concentración celular ($1,6 \times 10^8$ cels./ml), una vez descontado el volumen de los reactivos añadidos en cada caso, hasta alcanzar un volumen final de 500 µl.

4.2 EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS

4.2.1 CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA

La determinación de la concentración de las muestras espermáticas obtenidas tras el *swim-up* se calculó usando una cámara de Neubauer (Marienfeld, Germany), tras una dilución 1/100 con agua. Se colocó una gota de 6 µl en la cámara y se observó con objetivo 10x en un microscopio de contraste de fases. Se contaron las células existentes en 16 cuadrículas de la cámara y se aplicó la fórmula:

$$\text{CONCENTRACIÓN} = \frac{\text{Nº DE ESPERMATOZOIDES CONTADOS} \times 10^4 \times 1}{\text{DILUCIÓN}} = \text{ESPERMATOZOIDES/ML}$$

4.2.2 VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad se determinó mediante la doble tinción con ioduro de propidio y diacetato de carboxifluoresceína (IP/CFDA)⁵⁸. 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 4.1).

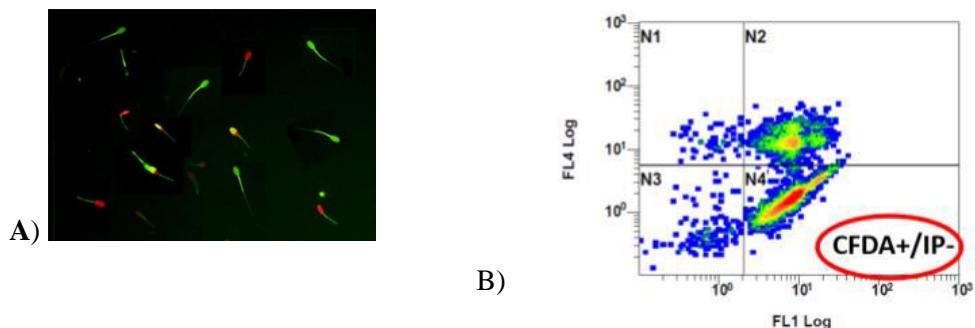


Figura 4.1: A) Doble tinción de los espermatozoides ovinos con ioduro de propidio y diacetato de carboxifluoresceína como se observaría con microscopía de fluorescencia en filtro B-2A (filtro de excitación 450-490 nm) y G-2A (filtro de excitación 510-560 nm) y 400x. B) Diagrama representativo de la integridad de membrana evaluado por citometría de flujo utilizando los fotodetectores FL1 y FL4.

Las muestras obtenidas tras el *swim-up* se diluyeron 1:60 y las alícuotas sometidas a capacitación 1:5 con medio de bifase (sacarosa 0,25 M, EGTA 0,1 mM, tampón fosfato sódico (pH 7,5) 4 mM, tampón HEPES 10x 10% (v/v)), para alcanzar en ambos casos una concentración de 6×10^6 células/ml. Se añadieron 3 μ l de formaldehido (5% v/v), 3 μ l de CFDA (0,46 mg/ml en DMSO) y 3 μ l de IP (7,3 μ M). La mezcla se incubó 10 minutos a 37 °C en oscuridad. La tinción se puede evaluar 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.

4.2.3 MOTILIDAD ESPERMÁTICA

Se evaluó utilizando una sistema computarizado de análisis espermático (CASA, Computer Assisted Semen Analysis), concretamente el ISAS 1.0.4 (Proiser SL, Valencia, España). Para ello se colocó una gota de 6 μ l de muestra *swim-up* diluida en medio bifase 1:10 y muestra capacitada sin diluir entre un porta- y un cubre-objetos previamente atemperados, y se observó con objetivo 10x en un microscopio de contraste de fase a través de un monitor de ordenador equipado con el sistema CASA. Se analizaron al menos cinco campos por gota y un mínimo de dos gotas por muestra. El programa es capaz de integrar las imágenes captadas mostrando la trayectoria de los espermatozoides y clasificándolos en función de su movimiento en estáticos y mótiles (lentos, medios y rápidos) (Figura 4.2).

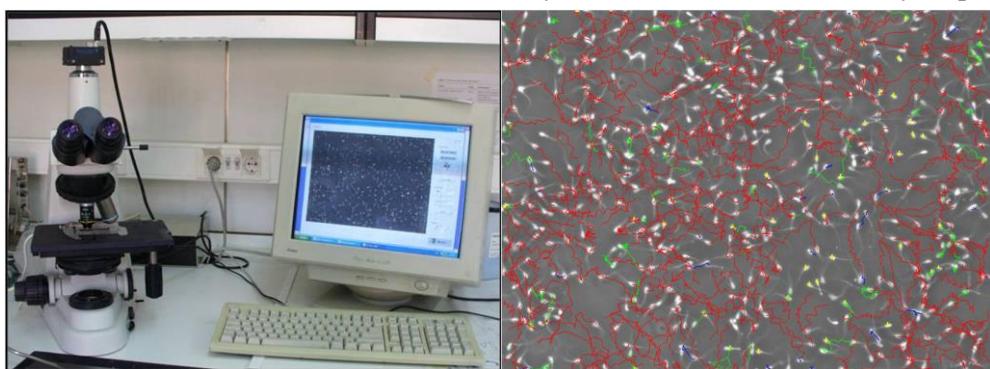


Figura 4.2: (A) Equipo de análisis de la motilidad espermática. (B) Análisis de la imagen microscópica (objetivo de 10x) integrada por el programa ISAS (Integrated Semen Analysis System). Aparecen marcados los espermatozoides estáticos (en amarillo), y la trayectoria de los espermatozoides mótiles lentos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

4.2.4 EVALUACIÓN DEL ESTADO DE CAPACITACIÓN

El estado de capacitación se estudió gracias a la tinción con clorotetraciclina (CTC). La CTC es un antibiótico que penetra al interior celular dónde 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. Esta técnica fue validada posteriormente por nuestro grupo para el estudio del estado de capacitación en la especie ovina³³. Para realizar la tinción se mezclaron 20 µl de muestra diluida con 20 µl de solución CTC (2 mg de CTC disueltos en 5 ml de un tampón compuesto por Tris 20 mM, cisteína 5 µM y NaCl 130 mM, pH 7,8) y 5 µl de un agente fijador (1,25% p/v de paraformaldehído en tampón TRIS-HCl 0,5 M). La mezcla se incubó a 4 °C durante al menos dos horas en oscuridad. Posteriormente, se depositaron sobre un portaobjetos 3 µl de trietilendiamina 0,22M (DABCO) diluida en glicerol : PBS (9:1 v/v) junto con 6 µl 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) (Figura 4.3).

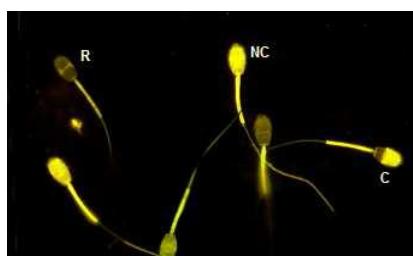


Figura 4.3: Espermatozoides ovino teñidos con CTC y visualizados con microscopía de fluorescencia bajo filtro V-2A y 100x. Se pueden distinguir espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (C) y reaccionados (R).

4.2.5 TRANSLOCACIÓN DE FOSFATIDILSERINA EN LA MEMBRANA ESPERMÁTICA

La fosfatidilserina (FS) es un fosfolípido presente en condiciones normales, en la cara interna de la membrana plasmática y que, en determinadas situaciones, como durante el proceso de apoptosis, 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 las tinciones se tomaron 10 µl de las muestras de *swim up* y las incubadas 3 horas en condiciones capacitantes y se añadieron 250 µl de tampón de anexina 1X (Binding Buffer Apoptosis Detection Kit). En oscuridad, se añadieron 1 µl de anexina-FITC y 3 µl de IP y se incubó 10 minutos a 37 °C. Se añadieron 4 µl de formaldehido, que actúa como agente fijador, y pasados cuatro minutos, se

añadieron 100 µl 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 ± 5 nm (para Ann) y FL4-675 ± 5 nm (para IP) del citómetro de flujo.

4.2.6 DETECCIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE RESIDUOS DE TIROSINA DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA ESPERMÁTICAS POR WESTERN BLOTTING

4.2.6.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS ESPERMÁTICAS

Se procedió a extraer las proteínas de membrana, por el método descrito por nuestro grupo (Colas *et al.*, 2008). A 200 µl de cada muestra (control, *cocktail* y *cocktail* con progesterona, y con las diferentes concentraciones de antagonista y agonista tras 3 horas decapacitación *in vitro*) conteniendo 8 x 10⁷ células/500 µl, se les añadieron 100 µl del medio de extracción (*ESB, Extraction Sample Buffer*), compuesto por 2% de SDS (dodecilsulfatosódico, p/v), TRIS-HCl 0,0626 mM (pH 6,8), 0,002% de azul de bromofenol diluido en glicerol al 10% (siendo la concentración final de glicerol del 1%), e inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA).

La mezcla se incubó inmediatamente durante 5 minutos a 100 °C en baño de arena. Después se centrifugó a 13.000 g, 5 minutos, a temperatura ambiente y se recogió el sobrenadante, desecharando el pellet formado. Finalmente, se añadieron 2-mercptoetanol y glicerol, a una concentración final del 5% y el 1%, respectivamente, y los lisados se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis.

4.2.6.2 SDS-PAGE Y WESTERN-BLOTTING

Las proteínas se separaron en una dimensión siguiendo el método Laemmli⁵⁹, utilizando patrones de comparación de pesos moleculares, de 10 a 250 kDa (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Se utilizaron geles de acrilamida del 10% y las condiciones de electroforesis fueron 130 V durante 90 min. a 4 °C. Una vez separadas las proteínas, fueron transferidas a una membrana de Immobilon-P (*Millipore*, Bedford, MA, USA), utilizando una unidad de transferencia en húmedo, modelo Mini-Protean 3 Cell y el módulo Mini Trans-Blot® de *BioRad* (BioRaD, Hercules, CA).

Una vez realizada la transferencia de las proteínas, los sitios no específicos de unión de las membranas se bloquearon incubándolas 1 hora con 5% BSA (w/v), a temperatura ambiente en un tampón fosfato salino (NaCl 136 mM, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 1,44 g/l, KH₂PO₄ 0,24 g/l, y Tween-20 0,5%, pH 7,4).

La detección de la fosforilación de tirosinas de las proteínas de membrana se realizó a través de la incubación con el anticuerpo primario monoclonal anti-fosftirosinas (clone 4G10®; Merck Millipore, Darmstadt, Germany), diluido 1/1000 en 0,1 PBS Tween-20 con 1% BSA durante toda la noche a 4 °C. Tras realizar tres lavados de 15 minutos de duración con 0,1% PBS Tween-20, las membranas se incubaron con el anticuerpo (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 OdisseyClx (Pierce ECL Western Blotting Detection System; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) y se cuantificó la señal para determinar la intensidad relativa de las bandas de fosftirosinas de las proteínas con el programa Quantity One software (Bio Rad, Hercules, CA, USA).

4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron con el software *GradPad In Stat* (5.01; San Diego, CA, USA) y el programa SPSS en el que se utilizó un análisis de chi-cuadrado para analizar la existencia de diferencias significativas, en la motilidad, en la viabilidad, en el estado de capacitación y translocación de FS y se empleó un análisis de varianza (one-way ANOVA) para la comparación de las señales de fluorescencia correspondientes a los western-blotting con anti-fosfotirosinas. Los resultados se muestran como la media ± S.E.M. (error estándar de la media).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. EFECTO DE UN AGONISTA DE LOS RECEPTORES DE PROGESTERONA, EL TANAPROGET, SOBRE ESPERMATOZOIDES OVINOS INCUBADOS EN CONDICIONES CAPACITANTES

5.1.1 EFECTO SOBRE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA

Ninguno de los tratamientos afectó la motilidad total (Figura 5.1.A). El porcentaje de espermatozoides mólicos totales obtenidos tras el *swim-up* ($90,80 \pm 1,20\%$) se mantuvo prácticamente sin cambios tras una hora de incubación en condiciones capacitantes en las muestras control ($87,40 \pm 1,03\%$) así como en las muestras en medio *cocktail* ($89,80 \pm 1,24\%$), con P4 ($88,40 \pm 1,17\%$) y con distintas concentraciones del agonista de P4 (tanaproget; $87,80 \pm 2,27\%$ y $87,80 \pm 2,01\%$ para $5 \mu\text{M}$ y $1 \mu\text{M}$ de tanaproget, respectivamente). Igualmente, tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes tampoco se observaron cambios significativos entre las muestras.

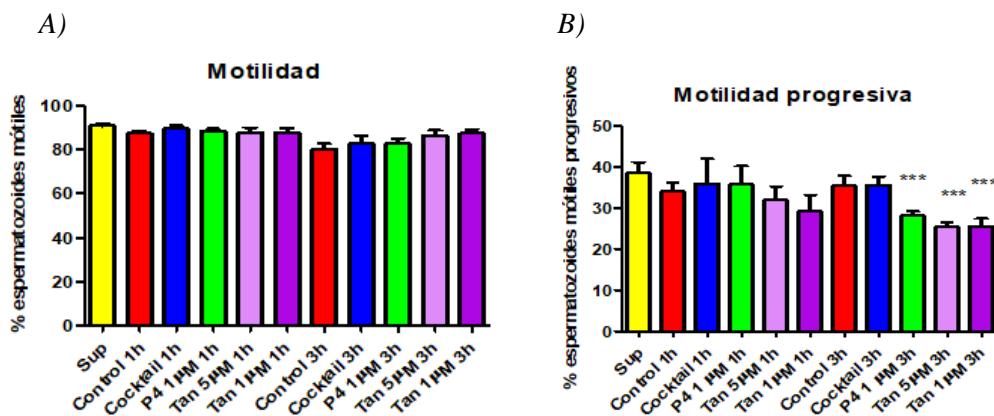


Figura 5.1: Porcentaje de espermatozoides mólicos (A) y mólicos progresivos (B) antes de la capacitación (Sup) y tras 1 y 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39°C , 5% de CO_2 y 100% humedad), en medio TALP (control), con alto AMPc (cocktail), cocktail con progesterona (P4 1 μM), y cocktail con diferentes concentraciones de tanaproget (Tan 5 μM y Tan 1 μM). Los valores se representan como media ± S.E.M. ($n=5$) *** $P<0,001$ comparando con la muestra cocktail.

En cuanto al porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, el valor inicial tras el *swim up* ($38,60 \pm 2,64\%$) disminuyó tras una hora de incubación en condiciones capacitantes en todas las muestras, sin observarse diferencias significativas entre ellas (Figura 5.1.B). Sin embargo, tras 3 horas de incubación, hubo una disminución muy significativa ($P<0,001$) respecto al *cocktail* ($35,7 \pm 2,03\%$)

en el porcentaje de espermatozoides mótiles progresivos en la muestra *cocktail* con P4 ($28,20 \pm 0,97\%$) y con el tanaproget a 5 μM ($25,40 \pm 1,17\%$) y 1 μM ($25,60 \pm 1,78\%$). Por tanto, el agonista de los receptores de P4, el tanaproget, tanto a 1 como a 5 μM , dio lugar a un cambio en el patrón de motilidad de forma incluso más drástica que la P4, disminuyendo la motilidad progresiva, fenómeno asociado generalmente al proceso de capacitación espermática¹³.

5.1.2 EFECTO SOBRE LA INTEGRIDAD DE MEMBRANA

La integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides no se vio afectada por la incubación en condiciones capacitantes. Ni la P4 ni el tanaproget a las dosis utilizadas provocaron ningún efecto sobre la viabilidad espermática (Fig. 5.2).

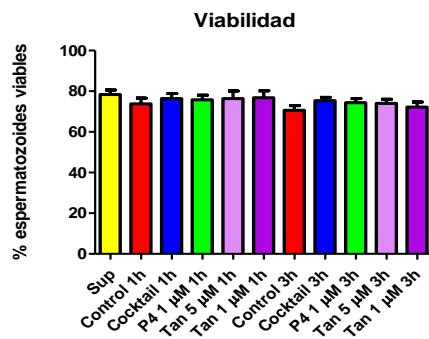


Figura 5.2: Porcentaje de espermatozoides con membrana intacta (CFDA+/PI-) antes de la capacitación (Sup) y tras 1 y 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39°C , 5% de CO_2 y 100% humedad), en medio TALP (control), con alto AMPc (Cocktail), cocktail con progesterona (P4 1 μM), y cocktail con diferentes concentraciones de tanaproget (Tan 5 μM y Tan 1 μM). Los valores se representan como media \pm S.E.M. ($n=5$).

5.1.3 EFECTO SOBRE LA DISTRIBUCIÓN INTRACELULAR DEL CALCIO

Tras una hora de incubación en condiciones capacitantes, el porcentaje de espermatozoides capacitados evaluados mediante la tinción con clorotetraciclina (CTC) aumentó en todas las muestras incubadas en medio *cocktail*, tanto sin hormona ($35,00 \pm 3,30\%$) como con P4 ($38,20 \pm 3,65\%$) o tanaproget 5 μM ($37,60 \pm 4,11\%$) y especialmente a 1 μM ($41,80 \pm 4,20\%$) con respecto a la muestra inicial ($28,00 \pm 1,41\%$). Sin embargo, la muestra incubada en el medio TALP (control) presentó valores similares a la inicial ($27,20 \pm 3,97\%$) (Figura 5.3).

Tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes se observó en general una disminución de espermatozoides no capacitados, concomitante con un incremento de los capacitados y los que han sufrido la reacción acrosómica (Figura 5.3). El porcentaje de espermatozoides reaccionados fue significativamente mayor en las muestras con P4 ($33,80 \pm 3,71\%$) y con tanaproget 5 μM ($30,60 \pm 3,75\%$) y 1 μM ($29,80 \pm 2,08\%$) con respecto al *cocktail* sin hormona ($23,60 \pm 2,77\%$).

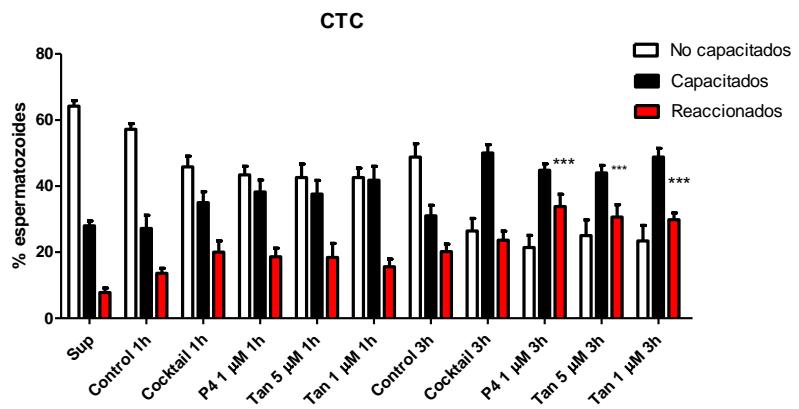


Figura 5.3: Porcentaje de espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados según la tinción de clorotetraciclina (CTC), antes de la capacitación (Sup) y tras 1 y 3 horas de incubación en condiciones capacitantes ($39\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% de CO_2 y 100% humedad), en medio TALP (control), con alto AMPc (cocktail), cocktail con progesterona (P4 1 μM) y cocktail con diferentes concentraciones de tanaproget (Tan 5 μM y Tan 1 μM). Los valores se representan como media \pm S.E.M. ($n=5$ *** $P<0,001$ comparando con la muestra cocktail).

Estos resultados confirman los obtenidos por nuestro grupo de investigación del efecto inductor de la progesterona sobre la reacción acrosómica de los espermatozoides, y por otro demuestra que el agonista de los receptores de P4, tanaproget, está produciendo el mismo efecto que la P4 en el proceso de capacitación e inducción de la reacción acrosómica de espermatozoides ovinos.

5.1.4 EFECTO SOBRE LA FOSFORILACIÓN EN RESIDUOS DE TIROSINA DE PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA

A pesar de que en las membranas analizadas tras el *western-blotting* se pudo apreciar claramente una menor fosforilación en residuos de tirosinas en la muestra control (carril 1) que en el resto de muestras (Figura. 5.4.A), el análisis estadístico realizado tras la cuantificación densitométrica de todas las membranas (Figura. 5.4.B) no reveló diferencias significativas, probablemente debido a la magnitud del error estándar para cada muestra, consecuencia de la variación en la intensidad media de la señal de fluorescencia en cada membrana. Del mismo modo, a pesar de apreciarse una tendencia a la disminución en la señal en muestras con P4 y especialmente en muestras con tanaproget, estas diferencias tampoco fueron significativas.

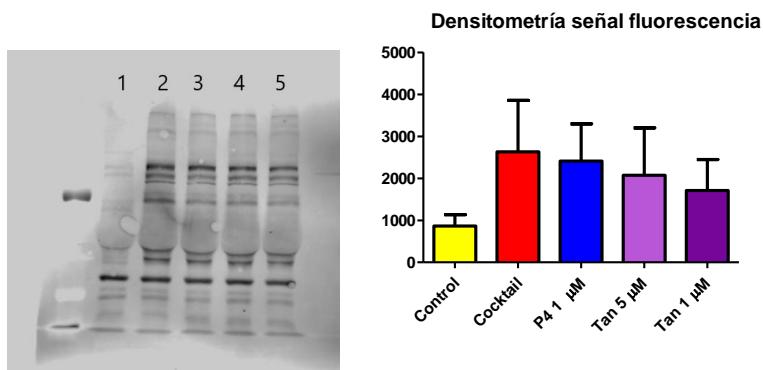


Figura 5.4: A) Membrana representativa de los ensayos de western-blott utilizando anticuerpos anti-fosfotirosinas en proteínas extraídas de muestras tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39°C , 5% de CO_2 y 100% humedad) : (1) en medio TALP (control), (2) con alto AMPc (cocktail), (3) cocktail con P4 1 μM , (4) cocktail 5 μM tanaproget y (5) cocktail 1 μM tanaproget. B) Cuantificación densitométrica de la señal de fluorescencia de las diferentes membranas analizadas. Los valores se representan como media \pm S.E.M. ($n=4$).

El aumento en la fosforilación de tirosinas de proteínas de la membrana espermática es un proceso que se asocia con la capacitación *in vitro* en espermatozoides de mamíferos^{13,15,34}, y que ha sido demostrado en la especie ovina⁶⁰. En este caso, hay que tener en cuenta que la presencia de P4 y del agonista de PRs provoca además un gran aumento de espermatozoides que han sufrido la reacción acrosómica. Esto implica una enorme remodelación de las proteínas de la membrana, de modo que parte de esas proteínas fosforiladas se hayan perdido o modificado, como ya demostró nuestro grupo en estudios anteriores⁶¹.

5.1.5 EFECTO SOBRE LA TRANSLOCACIÓN DE FOSFATIDILSERINA (FS)

La presencia de progesterona ($19,50 \pm 8,15\%$) o del agonista tanaproget, tanto a 5 μM ($21,50 \pm 6,84\%$) como a 1 μM ($28,00 \pm 8,94\%$) provocó un aumento significativo del porcentaje de espermatozoides con translocación de fosfatidilserina en la membrana a las 3 horas de incubación en condiciones capacitantes, en comparación con la muestra cocktail sin hormona ($13,75 \pm 2,18\%$; $p<0,05$) (Figura 5.5). Mientras que en células somáticas la translocación de FS en la membrana plasmática es un indicador del proceso apoptótico, en espermatozoides este evento también se asocia con la reorganización de la membrana espermática que tiene lugar durante la capacitación. Por tanto, estos resultados concuerdan con el incremento de espermatozoides capacitados y reaccionados producidos por la P4 y el tanaproget descrito anteriormente (apdo. 5.3).

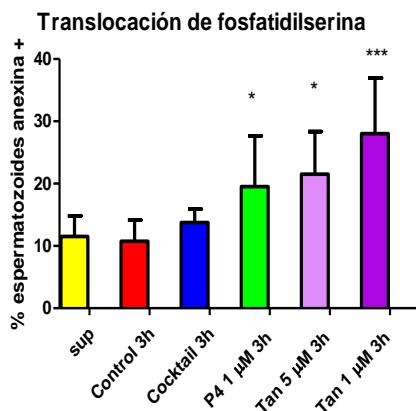


Figura 5.5: Porcentaje de espermatozoides con translocación de FS (annexin+) tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes ($39\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% de CO_2 y 100% humedad), en medio TALP (control), con alto AMPc (cocktail), cocktail con progesterona $1\text{ }\mu\text{M}$ (P4) y cocktail con diferentes concentraciones de tanaproget (Tan $5\text{ }\mu\text{M}$ y Tan $1\text{ }\mu\text{M}$). Los valores se representan como media \pm S.E.M. ($n=4$), (* $P<0,05$, ** $P<0,01$ y *** $P<0,001$ comparando con la muestra cocktail).

5.2. EFECTO DE UN ANTAGONISTA DE RECEPTORES DE PROGESTERONA, LA MIFEPRISTONA, SOBRE LA ACCIÓN DE LA P4 EN ESPERMATOZOIDES OVINOS INCUBADOS EN CONDICIONES CAPACITANTES

5.2.1. EFECTO SOBRE LA ACCIÓN DE LA P4 EN LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA

Ninguno de los tratamientos afectó la motilidad total (Figura 5.6.A). El porcentaje de espermatozoides mótiles totales obtenidos tras el *swim-up* ($79,67 \pm 4,97\%$) se mantuvo prácticamente sin cambios tras una hora de incubación en condiciones capacitantes en todas las muestras: control ($80,00 \pm 4,93\%$), *cocktail* ($80,67 \pm 4,33\%$), *cocktail* con P4 ($85,67 \pm 6,94\%$), y *cocktail* con P4 añadida tras la incubación previa con Mifepristona $40\text{ }\mu\text{M}$ ($80,33 \pm 7,22\%$) y $4\text{ }\mu\text{M}$ ($82,00 \pm 2,65\%$). Tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes se observó un descenso de la motilidad total en todas las muestras estudiadas, aunque estas diferencias no fueron significativas.

En cuanto al porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, el valor inicial tras el *swim-up* ($26,67 \pm 1,45\%$) disminuyó tras una hora de incubación en todas las muestras, si bien este descenso no fue significativo (Figura 5.6.B). Tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes, todas las muestras presentaron valores inferiores a los iniciales, siendo estas diferencias significativas para la muestra *cocktail* ($15,00 \pm 5,69\%$), P4 ($12,50 \pm 7,50\%$) y mifepristona $4\text{ }\mu\text{M}$ ($11,67 \pm 2,03\%$) respecto al control ($21,67 \pm 8,88\%$) (Figura 5.6.B). Cabe destacar que la muestra incubada con mifepristona $40\text{ }\mu\text{M}$ antes de la adición de P4 fue la que mejor mantuvo la motilidad progresiva de los espermatozoides ($22,33 \pm 1,64\%$) en contraposición con la tratada con $4\text{ }\mu\text{M}$ que mostró el menor valor ($11,67 \pm 2,03\%$). Estos resultados indican que $4\text{ }\mu\text{M}$ es más idónea para ejercer como antagonista de receptores de progesterona en estas condiciones.

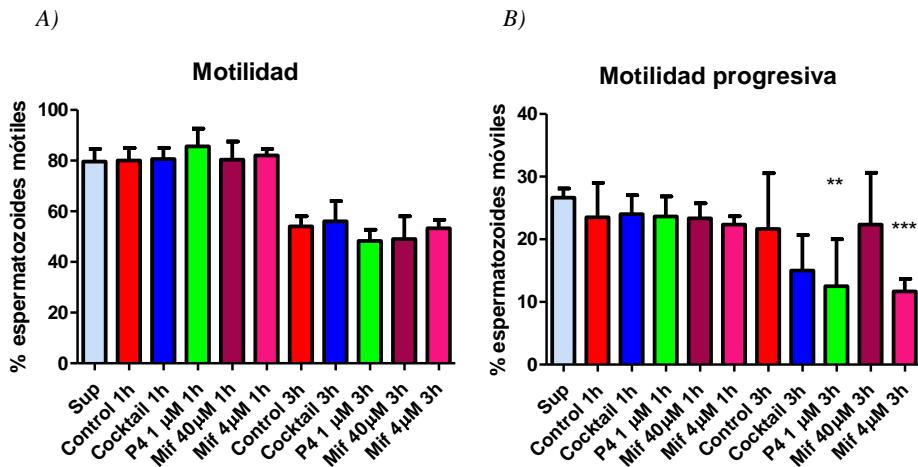


Figura 5.6: Porcentaje de espermatozoides mótiles (A) y mótiles progresivos (B) antes de la capacitación (Sup) y tras 1 y 3 horas de incubación en condiciones capacitantes ($39\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% de CO_2 y 100% humedad), en medio TALP (control), con alto AMPc (cocktail), cocktail con progesterona ($\text{P4 } 1\mu\text{M}$) y cocktail con $\text{P4 } 1\mu\text{M}$ y diferentes concentraciones de mifepristona ($\text{Mif } 40\text{ }\mu\text{M}$ y $\text{Mif } 4\text{ }\mu\text{M}$) añadidas previamente.). Los valores se representan como media \pm S.E.M. ($n=3$). ** $P<0,01$ y *** $P<0,001$ comparando con la muestra control

Tal y como se ha comentado anteriormente, la capacitación va asociada con cambios en el patrón de movimiento, y concretamente con un descenso en la motilidad progresiva ^{1 3}. Por tanto, los cambios observados en el presente trabajo podrían estar asociados al efecto producido por el antagonista de receptores de progesterona en la capacitación.

5.2.2 EFECTO SOBRE LA ACCIÓN DE LA P4 EN LA INTEGRIDAD DE MEMBRANA

Como se observa en la figura 5.7, la viabilidad de la muestra obtenida tras el *swim-up* ($72,50 \pm 2,50\%$) disminuyó tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes en todas las muestras: control ($57,00 \pm 1,00\%$), cocktail ($56,50 \pm 6,50\%$), P4 ($51,50 \pm 6,50\%$), P4 con mifepristona $40\text{ }\mu\text{M}$ ($59,00 \pm 4,00\%$) y P4 y mifepristona $4\text{ }\mu\text{M}$ ($68,50 \pm 0,50\%$), aunque sin diferencias significativas entre ellas.

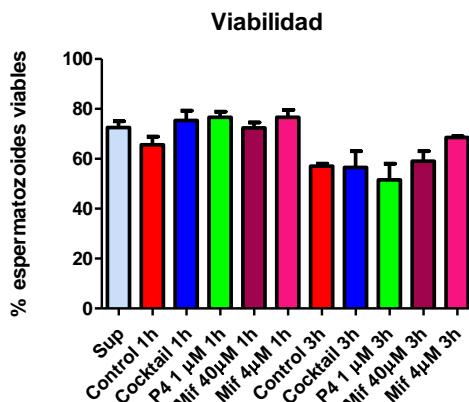


Figura 5.7: Porcentaje de espermatozoides con membrana intacta (CFDA+/PI-) antes de la capacitación (Sup) y tras 1 y 3 horas de incubación en condiciones capacitantes ($39\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% de CO_2 y 100% humedad), en medio TALP (control), con alto AMPc (cocktail), cocktail con progesterona ($\text{P4 } 1\mu\text{M}$), y cocktail con $\text{P4 } 1\mu\text{M}$ y diferentes concentraciones de mifepristona ($\text{Mif } 40\text{ }\mu\text{M}$ y $\text{Mif } 4\text{ }\mu\text{M}$) añadidas previamente. Los valores se representan como media \pm S.E.M. ($n=4$)

5.2.3 EFECTO SOBRE LA ACCIÓN DE LA P4 EN LA DISTRIBUCIÓN INTRACELULAR DEL CALCIO

Como se aprecia en la figura 5.8, tras una hora de incubación en condiciones capacitantes, el porcentaje de espermatozoides capacitados evaluados mediante la tinción con clorotetraciclina (CTC), aumentó ligeramente en la muestra *cocktail* sin y con P4 ($22,67 \pm 1,76\%$ y $25,67 \pm 4,18\%$, respectivamente) con respecto a la muestra inicial (*sup* $14,67 \pm 2,91\%$), aunque al igual que ocurría en las experiencias con el agonista (apdo. 5.1.3), las diferencias no fueron significativas. La incubación con mifepristona previa a la adición de P4 mantuvo un porcentaje de espermatozoides capacitados semejante a los de la muestra inicial ($16,00 \pm 4,16\%$ y $14,50 \pm 0,50\%$ para $40 \mu\text{M}$ y $4 \mu\text{M}$, respectivamente).

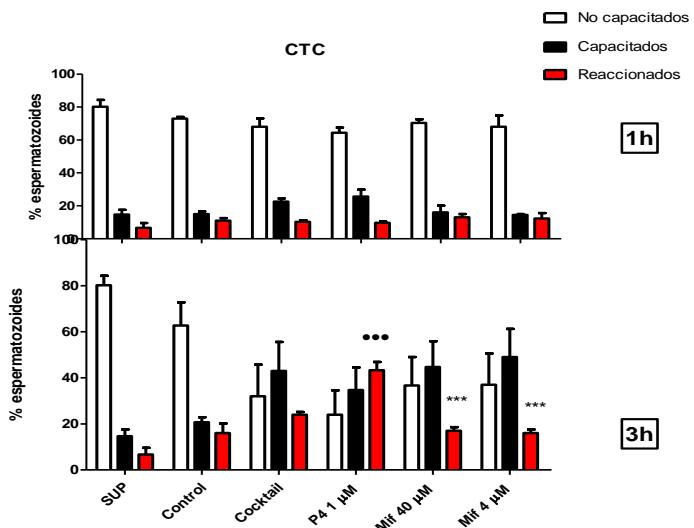


Figura 5.8: Porcentaje de espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados según la tinción de clorotetraciclina (CTC), antes de la capacitación (Sup) y tras 1y 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39°C , 5% de CO_2 y 100% humedad), en medio TALP (control), con alto AMPc (cocktail), cocktail con progesterona (P4 $1 \mu\text{M}$) y cocktail con P4 $1 \mu\text{M}$ diferentes concentraciones de mifepristona (Mif $40 \mu\text{M}$ y Mif $4 \mu\text{M}$) añadidas previamente. Los valores se representan como media \pm S.E.M. ($n=4$) (**P<0,001 comparando con la muestra P4 $1 \mu\text{M}$ y ***P<0,001 comparando con la muestra cocktail)

A las 3 horas el porcentaje de espermatozoides capacitados en relación con la muestra de P4 ($34,67 \pm 9,82\%$) disminuyó respecto al *cocktail* ($43,00 \pm 12,58\%$), aunque esta diferencia no fue significativa. Sin embargo este porcentaje se mantuvo sin cambios en las muestras con mifepristona ($44,67 \pm 11,28\%$ y $49,00 \pm 12,29\%$ Mif $40 \mu\text{M}$ y Mif $4 \mu\text{M}$, respectivamente). También se pudo observar un aumento significativo ($p<0,001$) en el porcentaje de espermatozoides reaccionados en la muestra *cocktail* con P4 ($43,3 \pm 3,53\%$) respecto al *cocktail* sin hormona ($25,0 \pm 1,0$) (Figura 5.8), lo que concuerda con los resultados obtenidos en el estudio anterior (apdo. 5.1.3). Respecto a las muestras con P4 incubadas previamente con mifepristona, se observó que el porcentaje de espermatozoides reaccionados fue significativamente menor ($17,00 \pm 1,53\%$ y $16,00 \pm 1,53\%$ con Mif $40 \mu\text{M}$ y Mif $4 \mu\text{M}$, respectivamente), en comparación con la muestra sólo con P4 ($43,3 \pm 3,53\%$, $p<0,001$). Estos datos demuestran que, efectivamente, la mifepristona inhibe los receptores de progesterona, impidiéndolos efectos producidos por la hormona.

5.2.4 EFECTO SOBRE LA ACCIÓN DE LA P4 EN LA FOSFORILACIÓN EN RESIDUOS DE TIROSINAS DE LAS PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICAS

Tras la cuantificación densitométrica de la señal de todas las membranas analizadas (figura. 5.9.B), al igual que ocurría en los experimentos llevados a cabo con el agonista de PRs, no se observaron diferencias significativas, probablemente debido la variación en la intensidad media de la señal de fluorescencia en cada membrana.

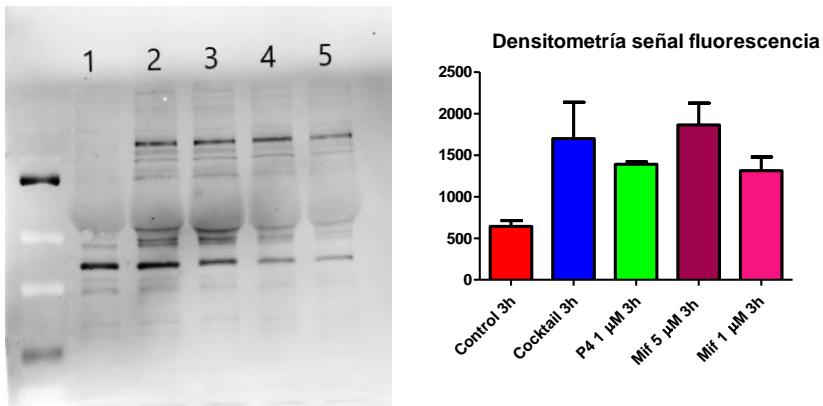


Figura 5.9: A) Membrana representativa de los ensayos de western-blott utilizando anticuerpos anti-fosfotiroxinas en proteínas extraídas de muestras espermáticas tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes ($39\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% de CO_2 y 100% humedad) (1) en medio TALP (control), (2) con alto AMPc (cocktail), (3) cocktail con $\text{P}4$ $1\mu\text{M}$, (4) cocktail con $\text{P}4$ $1\mu\text{M}$ y de mifepristona $40\text{ }\mu\text{M}$ y (5) cocktail con $\text{P}4$ $1\mu\text{M}$ y demifepristona $4\text{ }\mu\text{M}$ (en ambos casos la de mifepristona se añadió previamente. B) Cuantificación densitométrica de la señal de fluorescencia de las diferentes membranas analizadas. Los valores se representan como media \pm S.E.M. ($n=4$)

5.2.5. EFECTO SOBRE LA ACCIÓN DE LA P4 EN LA TRANSLOCACIÓN DE FOSFATIDILSERINA (FS) EN LA MEMBRANA ESPERMÁTICA

Del mismo modo, en las muestras con P4 previamente tratadas con diferentes concentraciones de mifepristona se observó una disminución significativa ($P < 0,001$) del porcentaje de espermatozoides con translocación de FS (anexina+) ($20,67 \pm 3,38\%$ y $24,67 \pm 2,91\%$ para Mif $40\text{ }\mu\text{M}$ y $4\text{ }\mu\text{M}$, respectivamente) respecto a la muestra incubada solo con P4 ($35,67 \pm 2,40\%$) como a la muestra cocktail sin hormona ($35,67 \pm 2,40\%$) (Figura 5.10).

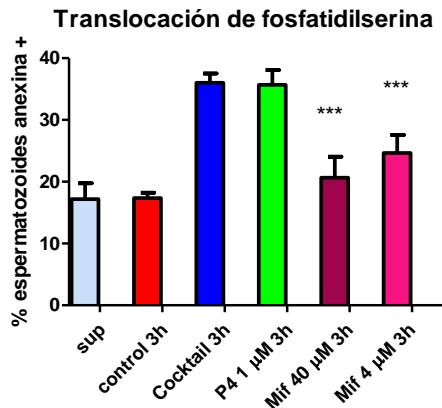


Figura 5.10: Porcentaje de espermatozoides con traslocación de fosfatidilserina (anexina+) tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39°C , 5% de CO_2 y 100% humedad) en medio TALP (control), con alto AMPc (cocktail), cocktail con progesterona ($\text{P}4\ 1\ \mu\text{M}$) y cocktail con $\text{P}4\ 1\ \mu\text{M}$ y diferentes concentraciones de mifepristona (Mif $40\ \mu\text{M}$ y Mif $4\ \mu\text{M}$) añadidas previamente. Los valores se representan como media \pm S.E.M. ($n=4$). *** $P<0,001$ comparando con la muestra $\text{P}4\ 1\ \mu\text{M}$.

Los últimos estudios han relacionado el aumento en la translocación de fosfatidilserina con una entrada en el proceso de capacitación de los espermatozoides¹⁷. Los resultados obtenidos en el presente trabajo apuntarían a que la progesterona induciría la capacitación y posterior reacción acrosómica, y la mifepristona, al inhibir los receptores de esta hormona, bloquearía este proceso.

Todos estos resultados nos podrían llevar a pensar que, a nivel práctico, el uso de agonista y antagonista de receptores de P4 podría mejorar el rendimiento en dosis de espermatozoides de inseminación en ovino y así ajustar el estado de capacitación del espermatozoide al instante en el que se requiera la fecundación.

6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se pueden deducir las siguientes conclusiones:

- La incubación en condiciones capacitantes con progesterona $1\ \mu\text{M}$, no produce cambios en el porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra ni en la motilidad total, aunque disminuye el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva.
- La incubación en condiciones capacitantes con $1\ \mu\text{M}$ o $5\ \mu\text{M}$ del agonista de los receptores de P4, el tanaproget, disminuye el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, incrementa el de los que han experimentado la reacción acrosómica así como el de los que presentan translocación de fosfatidilserina.
- La incubación en condiciones capacitantes con un antagonista de los receptores de progesterona, la mifepristona, a concentración $4\ \mu\text{M}$ y $40\ \mu\text{M}$, previa a la adición de la hormona, bloquea el efecto de la progesterona en los espermatozoides inhibiendo la capacitación y posterior reacción acrosómica, disminuyendo la translocación de fosfatidilserina en la membrana espermática y sin modificar el porcentaje de espermatozoides mótiles o con membrana íntegra. La incubación con $40\ \mu\text{M}$ antes de la adición de la hormona

impide la disminución de espermatozoides con motilidad progresiva provocada por la progesterona.

- El efecto de la progesterona sobre la capacitación y posterior reacción acrosómica, así como las acciones concomitantes como el incremento en la translocación de fosfatidilserina que se produce en la membrana plasmática de los espermatozoides, y el descenso en la motilidad progresiva, están mediados por la unión de esta hormona a sus receptores de membrana, ya que un agonista produce el mismo efecto y un antagonista lo inhibe.

CONCLUSIONS

- Incubation under capacitating conditions with 1 μM progesterone doesn't produce changes in the percentage of sperm with either integral membrane or total motility, although it decreases that of sperm with progressive motility.
- The addition of the P4 receptor agonist, tanaproget, significantly increases the percentage of acrosome-reacted spermatozoa as well as that of those with phosphatidylserine translocation, and decreases the percentage of sperm with progressive motility.
- The addition of the progesterone receptor antagonist, mifepristone, prior to the addition of the hormone, blocks the effect of progesterone on spermatozoa inhibiting capacitation and the subsequent acrosome reaction, decreasing the translocation of phosphatidylserine in the sperm membrane without changes in the percentage of motile spermatozoa or with an integral membrane.
- The effect of progesterone on capacitation and subsequent acrosome reaction, as well as the concomitant actions such as the increase in phosphatidylserine translocation that occurs in the sperm plasma membrane and the decrease in progressive motility are mediated by the progesterone binding to its membrane receptors, since an agonist produces the same effects while an antagonist inhibits them.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Yanagimachi, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote Camb. Engl.* **2**, 371–372 (1994).
2. Vadnais, M. L., Galantino-Homer, H. L. & Althouse, G. C. Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation. *Arch. Androl.* **53**, 109–123 (2007).
3. Katz, D. F. & Yanagimachi, R. Movement characteristics of hamster and guinea pig spermatozoa upon attachment to the zona pellucida. *Biol. Reprod.* **25**, 785–791 (1981).
4. Leyton, L. & Saling, P. 95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell* **57**, 1123–1130 (1989).
5. Visconti, P. E. *et al.* Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Dev. Camb. Engl.* **121**, 1129–1137 (1995).
6. Pérez-Pé, R. *et al.* Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* **61**, 226–233 (2002).
7. Luna, C., Colás, C., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J. A. & Muñoz-Blanco, T. A novel epidermal growth factor-dependent extracellular signal-regulated MAP kinase cascade involved in sperm functionality in sheep. *Biol. Reprod.* **87**, 93 (2012).
8. Colas, C. *et al.* Cyclic-AMP initiates protein tyrosine phosphorylation independent of cholesterol efflux during ram sperm capacitation. *Reprod. Fertil. Dev.* **20**, 649–658 (2008).
9. Grasa, P. *et al.* Changes in content and localization of proteins phosphorylated at tyrosine, serine and threonine residues during ram sperm capacitation and acrosome reaction. *Reprod. Camb. Engl.* **137**, 655–667 (2009).
10. Naz, R. K. Involvement of protein serine and threonine phosphorylation in human sperm capacitation. *Biol. Reprod.* **60**, 1402–1409 (1999).
11. Jha, K. N. *et al.* Evidence for the involvement of proline-directed serine/threonine phosphorylation in sperm capacitation. *Mol. Hum. Reprod.* **12**, 781–789 (2006).
12. Saling, P. M. & Storey, B. T. Mouse gamete interactions during fertilization in vitro. Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J. Cell Biol.* **83**, 544–555 (1979).
13. Aitken, R. J. *et al.* Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol. Reprod. Dev.* **47**, 468–482 (1997).
14. Leclerc, P. & Kopf, G. S. Mouse sperm adenylyl cyclase: general properties and regulation by the zona pellucida. *Biol. Reprod.* **52**, 1227–1233 (1995).
15. Visconti, P. E. *et al.* Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J. Reprod. Immunol.* **53**, 133–150 (2002).
16. Barroso Villa, G., Karchmer Krivitzky, S., Castelazo Morales, E., Carballo Mondragón, E. & Kably Ambe, A. [Changes in mitochondrial membrane potentials and its exponential relation with phosphatidylserine translocation in the plasma membrane as markers in the initial events of apoptosis: evaluation in different spermatocytic fractions]. *Ginecol. Obstet. Mex.* **70**, 182–189 (2002).
17. Trinidad, B. *et al.* *Apoptosis en Espermatozoides*. (2016).
18. Luna, C. *et al.* c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways link capacitation with apoptosis and seminal plasma proteins protect sperm by interfering with both routes†. *Biol. Reprod.* **96**, 800–815 (2017).
19. Visconti, P. E. *et al.* The molecular basis of sperm capacitation. *J. Androl.* **19**, 242–248 (1998).
20. Zeng, Y., Oberdorf, J. A. & Florman, H. M. pH regulation in mouse sperm: identification of Na(+)-, Cl(-)-, and HCO₃(-) -dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Dev. Biol.* **173**, 510–520 (1996).

21. Harrison, R. A., Ashworth, P. J. & Miller, N. G. Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol. Reprod. Dev.* **45**, 378–391 (1996).
22. Baldi, E. *et al.* Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J. Androl.* **12**, 323–330 (1991).
23. Colás, C., Cebrián-Pérez, J. A. & Muiño-Blanco, T. Caffeine induces ram sperm hyperactivation independent of cAMP-dependent protein kinase. *Int. J. Androl.* **33**, e187–197 (2010).
24. White, D. R. & Aitken, R. J. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Res.* **22**, 163–177 (1989).
25. Chaudhry, P. S. & Casillas, E. R. Calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases in plasma membranes of bovine epididymal spermatozoa. *Arch. Biochem. Biophys.* **262**, 439–444 (1988).
26. Flesch, F. M. & Gadella, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim. Biophys. Acta* **1469**, 197–235 (2000).
27. Baker, M. A., Hetherington, L., Ecroyd, H., Roman, S. D. & Aitken, R. J. Analysis of the mechanism by which calcium negatively regulates the tyrosine phosphorylation cascade associated with sperm capacitation. *J. Cell Sci.* **117**, 211–222 (2004).
28. DasGupta, S., Mills, C. L. & Fraser, L. R. Ca(2+)-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J. Reprod. Fertil.* **99**, 135–143 (1993).
29. Christian, A. E., Haynes, M. P., Phillips, M. C. & Rothblat, G. H. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J. Lipid Res.* **38**, 2264–2272 (1997).
30. Yancey, P. G. *et al.* Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration Of kinetic pools and mechanism of efflux. *J. Biol. Chem.* **271**, 16026–16034 (1996).
31. Gadella, B. M. & Harrison, R. a. P. 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 (2002).
32. Galantino-Homer, H. L., Visconti, P. E. & Kopf, G. S. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol. Reprod.* **56**, 707–719 (1997).
33. Grasa, P., Cebrián-Pérez, J. A. & Muiño-Blanco, T. Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation. *Reprod. Camb. Engl.* **132**, 721–732 (2006).
34. Baldi, E. *et al.* Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions. *Mol. Cell. Endocrinol.* **308**, 39–46 (2009).
35. Sagare-Patil, V. *et al.* Differential concentration and time dependent effects of progesterone on kinase activity, hyperactivation and acrosome reaction in human spermatozoa. *Int. J. Androl.* **35**, 633–644 (2012).
36. Rago, V. *et al.* Identification of G protein-coupled estrogen receptor in human and pig spermatozoa. *J. Anat.* **224**, 732–736 (2014).
37. Roldan, E. R., Murase, T. & Shi, Q. X. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science* **266**, 1578–1581 (1994).
38. Neild, D. N., Gadella, B. M., Agüero, A., Stout, T. a. E. & Colenbrander, B. Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.* **89**, 47–56 (2005).
39. Witte, T. S. & Schäfer-Somi, S. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* **102**, 181–193 (2007).
40. Fensome, A. *et al.* Synthesis and Structure–Activity Relationship of Novel 6-Aryl-1,4-dihydrobenzo[d][1,3]oxazine-2-thiones as Progesterone Receptor Modulators Leading to the Potent and Selective Nonsteroidal Progesterone Receptor Agonist Tanaproget. *J. Med. Chem.* **48**, 5092–5095 (2005).
41. Bruner-Tran, K. L., Zhang, Z., Eisenberg, E., Winneker, R. C. & Osteen, K. G. Down-regulation of endometrial matrix metalloproteinase-3 and -7 expression in vitro and therapeutic

- regression of experimental endometriosis in vivo by a novel nonsteroidal progesterone receptor agonist, tanaproget. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 1554–1560 (2006).
42. Bapst, J. L., Ermer, J. C., Ferron, G. M., Foss, D. & Orczyk, G. P. Pharmacokinetics and safety of tanaproget, a nonsteroidal progesterone receptor agonist, in healthy women. *Contraception* **74**, 414–418 (2006).
 43. Carbonell i Esteve, J. L., Perera Boza, O., Riverón Cobo, A. M., González, J. & Tomasi, G. Tratamiento de la endometriosis con 5mg o 25mg diarios de mifepristona durante 6 meses. Ensayo clínico aleatorizado, doble ciego. *Prog. Obstet. Ginecol.* **55**, 51–59 (2012).
 44. Ulmann, A. The development of mifepristone: a pharmaceutical drama in three acts. *J. Am. Med. Womens Assoc.* 1972 **55**, 117–120 (2000).
 45. Spitz, I. M. & Bardin, C. W. Mifepristone (RU 486) – A Modulator of Progestin and Glucocorticoid Action. *N. Engl. J. Med.* **329**, 404–412 (1993).
 46. Carbonell, J. L. et al. Mifepristona (600 mg) + misoprostol (400 µg) en el aborto del primer trimestre. *Prog. Obstet. Ginecol.* **44**, 361–367 (2001).
 47. Bygdeman, M., Swahn, M.-L., Gemzell-Danielsson, K. & Gottlieb, C. The use of progesterone antagonists in combination with prostaglandin for termination of pregnancy. *Hum. Reprod.* **9**, 121–125 (1994).
 48. Bartley, J., Brown, A., Elton, R. & Baird, D. T. Double-blind randomized trial of mifepristone in combination with vaginal gemeprost or misoprostol for induction of abortion up to 63 days gestation. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **16**, 2098–2102 (2001).
 49. Cires Pujol, M. et al. Métodos abortifacientes. Intercambiabilidad terapéutica del método lactato de etacridina. *Rev. Cuba. Farm.* **40**, 0–0 (2006).
 50. García Mirás, R. et al. Eficacia de la mifepristona como contraceptivo de emergencia al comparar dosis de 5 y 10 miligramos. *Rev. Cuba. Obstet. Ginecol.* **40**, 326–335 (2014).
 51. Ko, J. K. Y. et al. An in vitro study of the effect of mifepristone and ulipristal acetate on human sperm functions. *Andrology* **2**, 868–874 (2014).
 52. Ollero, M., Muiño-Blanco, T., López-Pérez, M. J. & Cebrián-Pérez, J. A. Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. *Int. J. Androl.* **19**, 287–292 (1996).
 53. Mortimer, D. Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity. *Reprod. Fertil. Dev.* **6**, 25–31 (1994).
 54. García-López, N., Ollero, M., Cebrián-Pérez, J. A. & Muiño-Blanco, T. Reversion of thermic-shock effect on ram spermatozoa by adsorption of seminal plasma proteins revealed by partition in aqueous two-phase systems. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **680**, 137–143 (1996).
 55. Alvarez, J. G. et al. 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. Oxf. Engl.* **8**, 1087–1092 (1993).
 56. Grasa, P. et al. Ram sperm selection by a dextran/swim-up procedure increases fertilization rates following intrauterine insemination in superovulated ewes. *J. Androl.* **25**, 982–990 (2004).
 57. Parrish, J. J., Susko-Parrish, J., Winer, M. A. & First, N. L. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* **38**, 1171–1180 (1988).
 58. Harrison, R. A. & Vickers, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **88**, 343–352 (1990).
 59. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
 60. Luna, C. et al. Ram seminal plasma proteins contribute to sperm capacitation and modulate sperm-zona pellucida interaction. *Theriogenology* **83**, 670–678 (2015).
 61. Barrios, B., Fernández-Juan, M., Muiño-Blanco, T. & Cebrián-Pérez, J. A. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *J. Androl.* **26**, 539–549 (2005).

8. ANEXOS

PROGESTERONE-INDUCED CHANGES IN THE RAM SPERM ACROSOME REACTION ARE INHIBITED BY THE ANTAGONIST MIFEPRISTONE

M.J. Santorromán, S. Gimeno-Martos, A. Casao, J.A. Cebrán-Pérez, T. Muñoz-Blanco, R. Pérez-Péz.



Department of Biochemistry and Molecular and Cellular Biology,
Environmental Sciences Institute of the University of Zaragoza (IUCa)
Faculty of Veterinary, University of Zaragoza, Spain

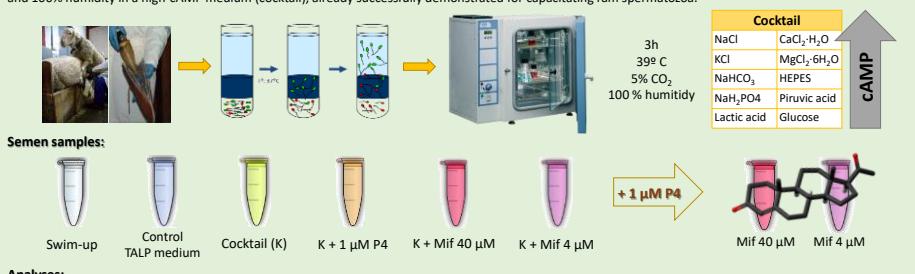


INTRODUCTION

Progesterone (P4) is an important hormone regulating the reproductive functions and may exert rapid non genomic effects on sperm functionality. P4 may stimulate sperm hyperactivation, chemotaxis, *in vitro* capacitation and the acrosome reaction in several species. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of progesterone on ram sperm functionality and to elucidate whether these actions are mediated by its binding to sperm membrane receptors. For this purpose, sperm samples were incubated in capacitating conditions in the presence of P4 with or without mifepristone (Mif), a progesterone receptor antagonist.

MATERIALS AND METHODS

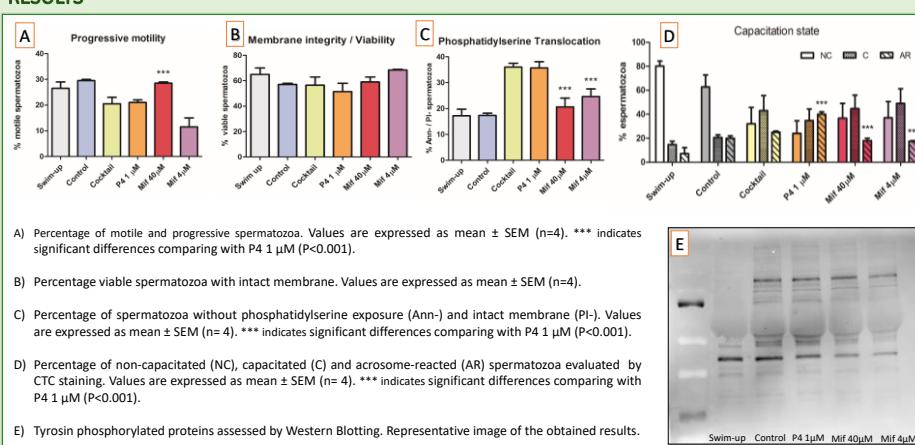
Semen samples obtained from nine rams were obtained with the aid of an artificial vagina, selected by a dextran/swim-up and incubated for 3 h at 39 °C, 5% CO₂ and 100% humidity in a high-cAMP medium (cocktail), already successfully demonstrated for capacitating ram spermatozoa.



Analyses:

- ❖ Computer-assisted sperm motility analysis (CASA) was performed using the ISAS 1.0.4 software (Proiser SL)
- ❖ Sperm membrane integrity (CFDA/PI staining)
- ❖ Phosphatidylserine exposure (Annexin V/PI staining)
- ❖ Capacitation state was evaluated by CTC (chlortetracycline) staining and visualized by fluorescence microscopy
- ❖ Tyrosine phosphorylation of membrane proteins were evaluated by Western Blotting

RESULTS



CONCLUSIONS

- The presence of P4 in capacitating conditions led to a significantly higher percentage of acrosome-reacted spermatozoa compared with the sample without hormone.
- The presence of Mifepristone at concentration 40 μM or 4 μM incubated in capacitating conditions significantly decreases the acrosome reaction, apoptotic markers and phosphorylation proteins.

P4 induces the acrosome reaction and apoptotic-like changes in ram spermatozoa and that these actions are mediated by sperm progesterone receptors, given that mifepristone is able to decrease both the acrosome reaction and apoptotic markers.

Grants: CICYT AGL 2014-57863-R and DGA 2016-A26 FSE