

INFLUENCIA DE PROGESTERONA Y ESTRADIOL EN LA ORIENTACIÓN ESPERMÁTICA OVINA

Gimeno, S., Alquezar-Baeta, C., Peinado, J., Nadal, P., Casao, A., Cebrián-Pérez, JA., Muíño-Blanco, T., y Pérez-Pé, R.

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

711778@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La progesterona (P_4) y $17\text{-}\beta$ estradiol (E_2) son dos hormonas esteroideas que juegan un papel fundamental en los procesos reproductivos de los mamíferos, fundamentalmente a través de la regulación de la expresión génica en el eje hipotalámico-hipofisario gonadal mediada por receptores nucleares. Sin embargo, estos últimos años se ha postulado la posible regulación no genómica de la funcionalidad espermática a través de receptores de membrana (Baldi et al., 2009). Diversos estudios sobre el efecto *in vitro* de la progesterona sugieren que estimula la capacitación espermática (Baldi et al., 2009), la hiperactivación y la reacción acrosómica (Sagare-Patil et al., 2012) en diversas especies (Lishko et al., 2011; Witte y Schafer-Somi, 2007). En cuanto al estradiol, los estudios sobre sus efectos en espermatozoides son contradictorios. Mientras que para algunos autores su función parece ser la de modular los efectos de la progesterona (Fujinoki et al., 2010; Sebkova et al., 2012; Vigil et al., 2008) (Fujinoki 2010), otros sugieren un efecto directo y estimulador sobre la capacitación, reacción acrosómica y capacidad fecundante (Adeoya-Osiguwa et al., 2003; Ded et al., 2013). Estas hormonas también podrían jugar un papel importante en la orientación espermática en el oviducto, para que pueda llegar al ovocito y fecundarlo, mediante un mecanismo de quimiotaxis (Armon y Eisenbach, 2011). Los espermatozoides responderían variando su direccionalidad en función de un gradiente de concentración de determinadas sustancias presentes en el fluido folicular y/o secretadas por las células del *cumulus* que rodean al ovocito (Bahat y Eisenbach, 2006). Entre las sustancias candidatas se encuentra principalmente la progesterona (Oren-Benaroya et al., 2008), ya comprobado en espermatozoides humanos (Teves et al., 2009) y de conejo (Guidobaldi et al. 2008). El objetivo del presente estudio es valorar el posible efecto quimiotáctico de la progesterona y el estradiol sobre espermatozoides ovinos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El semen utilizado se obtuvo mediante vagina artificial a partir de moruecos pertenecientes a la Asociación Nacional de Criadores de Ganado selecto de la raza Rasa Aragonesa (ANGRA), estabulados en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. Con el objetivo de eliminar las diferencias individuales, se trabajó con una mezcla de los segundos eyaculados de cuatro moruecos obtenidos tras un periodo de abstinencia de dos días (Ollero et al., 1996). Se utilizó el método *swim-up*/dextrano (García-López et al., 1996) para obtener una población espermática libre de plasma seminal. Para inducir la capacitación espermática *in vitro*, alícuotas de $1,6 \times 10^5$ céls/ml obtenidas tras *swim-up* se diluyeron en medio TALP (Parrish et al. 1988) con una mezcla de sustancias (*cocktail*) con capacidad de inducir la capacitación *in vitro* de los espermatozoides ovinos (Colas et al. 2008), y se mantuvieron a 39°C , 5% de CO_2 y 100% de humedad relativa durante 3 horas. La respuesta quimiotáctica se analizó utilizando una cámara Dunn, donde se depositaron 30 μl de muestra de espermatozoides a una concentración de $1,6 \times 10^7$ céls/ml en el pocillo central, y 90 μl medio de dilución (mHTF) (García-López et al., 1996) con o sin hormonas (progesterona (P_4) o estradiol (E_2)) en el pocillo exterior, creándose un gradiente de concentración de las mismas. Se ensayaron dos concentraciones de cada hormona, 100 pM y 1 μM , disueltas previamente en DMSO por lo que al medio de dilución se le adicionó la misma cantidad de DMSO (1/10000 (v/v)) como control. Se grabó un video durante 3 segundos utilizando una cámara (Basler, Exton, PA)

conectada al microscopio de contraste de fases (Nikon eclipse 50i, Nikon, Tokyo, Japan) y se analizó con un programa desarrollado recientemente por nuestro grupo de investigación basado en el software libre ImageJ (ImageJ Casa Biozar). El programa detecta las coordenadas de las trayectorias de los espermatozoides y las dibuja 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) y a partir de estos datos, se calculan dos índices, el índice Q (porcentaje de espermatozoides cuya dirección instantánea en cada fotograma entra dentro del cono quimiotáctico) y el índice SL (porcentaje de espermatozoides cuya trayectoria entra dentro del cono quimiotáctico en base a su posición inicial y final únicamente). El análisis estadístico se llevó a cabo con el software Gradpad InStat (5.01, San Diego, CA, EEUU).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, se evaluó la quimiotaxis en espermatozoides seleccionados por *swim-up*. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre muestras sometidas a un gradiente de progesterona o estradiol y la muestra control, ni en el índice Q (Fig 1, a y b) ni en el índice SL (Fig 1, c y d). En estas muestras seleccionadas por *swim-up* predominan los espermatozoides no capacitados, por lo que este resultado concordaría con estudios previos en los que se demostró que los espermatozoides no capacitados no responden a los fenómenos de atracción quimiotáctica (Perez-Cerezales et al., 2015). Sin embargo, cuando se realizaron los mismos análisis con espermatozoides capacitados *in vitro*, la presencia de P₄ a concentración 100 pM dió lugar a un incremento significativo en los dos índices indicativos de quimiotaxis, el índice Q y el SL respecto al control sin hormona (P<0,001) (Fig 2, a y c). Estos resultados coinciden con los obtenidos en estudios previos en espermatozoides humanos y de conejo (Teves et al., 2006). Con respecto al estradiol, la concentración mayor (1 µM) provocó un aumento significativo en los dos índices estudiados (Fig 2, b y d, P<0,001). Estos resultados revelan, por primera vez para el espermatozoide ovino, la capacidad de una respuesta quimiotáctica frente a la progesterona y el estradiol. Además, únicamente los espermatozoides capacitados y por consiguiente con potencial capacidad fecundante, serían capaces de responder a este estímulo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adeoya-Osiguwa, S. A., et al. (2003). Hum Reprod 18(1): 100-107.
- Armon, L., et al. (2011). PLoS One 6(12): e28359.
- Bahat, A., et al. (2006). Mol Cell Endocrinol 252(1-2): 115-119.
- Baldi, E., et al. (2009). Mol Cell Endocrinol 308(1-2): 39-46.
- Colas, C., et al. (2008). Reprod Fertil Dev 20(6): 649-658.
- Ded, L., et al. (2013). Reproduction 145(3): 255-263.
- Fujinoki, M. (2010). Reproduction 140(3): 453-464.
- #Garcia-Lopez, N., et al. (1996). J Chromatogr B Biomed Appl 680(1-2): 137-143.
- #Guidobaldi, H. A., et al. (2008). PLoS One 3(8): e3040.
- Lishko, P. V., et al. (2011). Nature 471(7338): 387-391.
- Miki, K., et al. (2013). Curr Biol 23(6): 443-452.
- Ollero, M., et al. (1996). Int J Androl 19(5): 287-292.
- Oren-Benaroya, R., et al. (2008). Hum Reprod 23(10): 2339-2345.
- Parrish, J. J., et al. (1988). Biol Reprod 38(5): 1171-1180.
- Perez-Cerezales, S., et al. (2015). Asian J Androl 17(4): 628-632.
- Sagare-Patil, V., et al. (2012). Int J Androl 35(5): 633-644.
- #Sebkova, N., et al. (2012). Reproduction 143(3): 297-307.
- Teves, M. E., et al. (2006). Fertil Steril 86(3): 745-749.
- Teves, M. E., et al. (2009). Plos One 4(12).
- Vigil, P., et al. (2008). Andrologia 40(3): 146-151.
- Wang, Y., et al. (2001). Gynecol Endocrinol 15(4): 286-292.
- Witte, T. S., et al. (2007). Anim Reprod Sci 102(3-4): 181-193.

Agradecimientos: AGL2014-57863-R, DGA-A26, BES-2015-072034

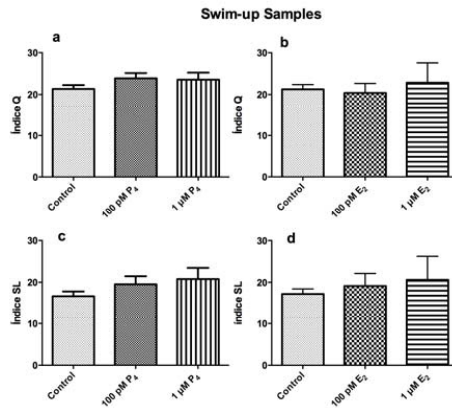


Figura 1. Análisis mediante cámara Dunn de los índices quimiotácticos Q (a y b) y SL (c y d) en espermatozoides ovinos seleccionados por swim-up, en presencia de un medio sin hormona (control) o un gradiente de progesterona (P₄) o de estradiol (E₂) a partir de una concentración 100 pM o 1 μM. Los resultados se muestran como media ± SEM de n=4.

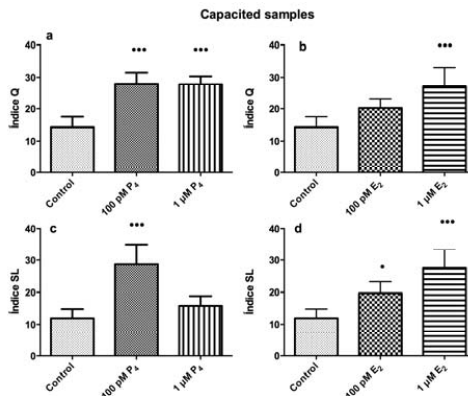


Figura 2. Análisis de los índices quimiotácticos Q (a y b) y SL (c y d) en espermatozoides ovinos capacitados *in vitro*, mediante cámara Dunn, en presencia de un medio sin hormona (control) o un gradiente de progesterona (P₄) o de estradiol (E₂) a partir de una concentración 100 pM o 1 μM. Los resultados se muestran como media ± SEM de n=4. *P<0,05, ***P<0,001 respecto al control.

PROGESTERONE AND ESTRADIOL INFLUENCE ON SPERMATIC ORIENTATION IN RAM SPERM

ABSTRACT: Progesterone (P₄) and 17-β estradiol (E₂) are essential hormones in mammalian reproduction. It has been proposed that steroid hormones could directly regulate the sperm functionality, including guidance towards the oocyte, essential for the sperm-oocyte binding. The aim of this project was to analyse the chemoattractant ability of these hormones. We assayed 100 pM or 1 μM concentration of P₄ and E₂, on fresh and *in vitro* capacitated ram spermatozoa using a Dunn camera and an experimental software developed by our group. P₄ is able to promoting chemotaxis in *in vitro* capacitated ram spermatozoa at a low concentration (100 pM, P<0,001) while E₂ does it at a high concentration (1 μM, P<0,001). It was demonstrated that both hormones are chemoattractants only for *in vitro* capacitated spermatozoa.

Keywords: ram sperm, chemotaxis, progesterone, estradiol