

EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO PARTICIPA EN LA CAPACITACIÓN *IN VITRO* DE ESPERMATOZOIDES OVINOS A TRAVÉS DE LA RUTA DE LAS MAP KINASAS

Luna-Valiente, C., Colás-Esteban, C., Domingo-Sanz, J., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez J.A., y Muiño-Blanco, T.

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

E-mail: caroluna@unizar.es

INTRODUCCIÓN

En estudios anteriores, nuestro grupo demostró que el incremento de adenosín 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) produce un aumento significativo de la proporción de espermatozoides ovinos capacitados *in vitro* (Colás et al., 2008), aunque otra vía de señalización celular debería de estar implicada en la regulación de la capacitación en esta especie. El objetivo de esta comunicación es estudiar la implicación del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en la capacitación, para lo que en primer lugar nos centramos en confirmar la presencia y localización de su receptor (EGFR) en la célula espermática. También se han estudiado variaciones en el porcentaje de espermatozoides capacitados, la fosforilación de proteínas en residuos de tirosinas y los posibles cambios en el patrón de motilidad en muestras incubadas en presencia de EGF.

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 en condiciones nutricionales uniformes. Con el objetivo de eliminar las diferencias individuales, se utilizó una mezcla de los segundos eyaculados de cuatro moruecos. Los experimentos se realizaron manteniendo los animales con un periodo de abstinencia de dos días, de acuerdo con estudios previos (Ollero et al., 1996).

La metodología utilizada para la obtención de espermatozoides libres de plasma seminal por un método de swim-up/dextrano, la evaluación de viabilidad (doble tinción con CFDA/PI), estado de capacitación (tinción con CTC) y fosforilación de proteínas en residuos de tirosinas, fue la descrita previamente (Pérez-Pé et al., 2002). Los parámetros de motilidad espermática se valoraron en el transcurso de la incubación utilizando un Sistema Computerizado de Análisis Seminal (Proiser SL, Buñol, España). En un portaobjetos previamente atemperado se colocó una gota de 6 μ l de la dilución seminal, que se cubrió con un cubreobjetos también atemperado. La visualización se realizó con un microscopio de contraste de fase con platina térmica atemperada a 37°C, conectado a una cámara de video, a su vez conectada a un ordenador con el *software* de análisis seminal. Para la evaluación de la hiperactivación se utilizaron dos parámetros: ALH, que mide el desplazamiento lateral de la cabeza, y LIN, que expresa linealidad (relación entre velocidad rectilínea y curvilínea). Los espermatozoides capacitados presentan $LIN \leq 45\%$ y $ALH \geq 3,5 \mu m$ (Colás et al. 2010).

Para inducir la capacitación espermática *in vitro*, alícuotas de $1,6 \times 10^8$ céls/ml seleccionadas mediante swim-up se introdujeron en una estufa de incubación en condiciones capacitantes (39°C, 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa) durante 3 horas. Las incubaciones se llevaron a cabo en medio TALP completo con 5 mg/ml de albúmina sérica bovina como muestra control. Para estudiar la implicación de EGF en la capacitación, se añadieron concentraciones crecientes de EGF (*Sigma Chemical Company.*, Madrid) a las alícuotas control, concretamente se ensayaron las concentraciones de 25, 50 y 100 nM de EGF. La fosforilación de proteínas en residuos de tirosina se analizó mediante western-blot, haciendo 3 ensayos de cada tipo y realizando estudios cuantitativos mediante densitometría. La presencia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se estudió mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) en muestras control y capacitadas en presencia de EGF. Se utilizó un anticuerpo primario anti-EGFR (1:40, *Abcam*, Cambridge, Reino Unido) y un secundario unido a fluoresceína (EGF Alexa Fluor-488, 1:500 *Molecular Probes Inc.*, Eugene, OR, EEUU). La preparación se visualizó en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400), con el objetivo 100x y un filtro B-2A. Los resultados del análisis estadístico se presentan como la media \pm desviación estándar del número de muestras indicado en cada caso. Para determinar la existencia o no de diferencias significativas entre muestras se

realizó el test ANOVA. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS (SPSS *software*, versión 15.0).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encontró receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en el acrosoma del 78,2 ± 3,5% de los espermatozoides de semen ovino fresco (Figura 1A, B). La especificidad de la señal se confirmó omitiendo la incubación con el anticuerpo primario anti-EGFR o con el secundario, encontrando ausencia total de señal fluorescente. La inducción de la capacitación en presencia de EGF no supuso un cambio significativo en la proporción de espermatozoides con señal (61,0 ± 7,6), ni en la distribución de EGFR. Estos resultados se confirmaron mediante western blot de lisados celulares, que mostraron la presencia de una banda de aproximadamente 170 kDa, que coincide con el peso molecular del receptor (Figura 1C).

Una vez confirmada la presencia de EGFR en espermatozoides ovinos, se estudió el efecto de la adición de EGF y comprobamos que estimuló significativamente la capacitación y la reacción acrosómica después de 3 horas de incubación (Figura 2). El porcentaje de espermatozoides capacitados aumentó de 36,2 ± 1,8% en muestras control a 46,6 ± 2,0%, 49,3 ± 5,6% y 49,9 ± 2,0% con 25, 50 y 100 nM de EGF, respectivamente. Los resultados obtenidos confirmaron que la adición al medio control TALP de EGF 100 nM, supuso no sólo un incremento en el porcentaje de espermatozoides capacitados, sino también un incremento significativo ($P < 0,01$) del 14,5 ± 0,6% en fosfotirosinas, concordando con los resultados obtenidos del estudio del patrón CTC (Figura 3).

Los valores medios de %LIN disminuyeron tanto en las muestras control como en las capacitadas en presencia de EGF en el transcurso de las 3 horas de incubación (45,4 ± 6,9% vs 43,1 ± 6,9% en las muestras control y 43,8 ± 4,1% vs. 42,1 ± 5,7% en muestras capacitadas con EGF; $n=11$). Curiosamente, también se observó un descenso en la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, en μm) a lo largo de las 3 horas (3,4 ± 0,4% vs 3,2 ± 0,4% en las muestras control y 3,6 ± 0,2% vs. 3,1 ± 0,3% en muestras capacitadas con EGF, $n=11$). No se observaron diferencias significativas en los dos parámetros considerados entre ambos grupos, aunque son resultados preliminares y es necesario contrastar datos de mayor número de ensayos.

Estos resultados pueden contribuir al conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la adquisición de la competencia espermática, y en última instancia, en la fertilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Colás, C., James, P., Howes, L., Jones, R., Cebrian-Perez, J.A., Muino-Blanco, T. 2008. *Reprod Fertil Dev* 20: 649-58.

Colás, C., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T. 2010. *Int J Androl* 33 (1): e187-97.

Ollero, M., Muiño-Blanco, T., Lopez-Perez, M.J., Cebrián-Pérez, J.A. 1996. *Int J Androl* 19: 287-292.

Pérez-Pé, R., Grasa, P., Fernández-Juan, M., Peleato, M.L., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T. 2002. *Mol Reprod Dev* 61: 226-33.

Agradecimientos: Financiado por CICYT-FEDER AGL 2008-01476, DGA B123/10 y beca predoctoral FPU 2009-1298. Los autores agradecen a ANGRA el suministro de sementales.

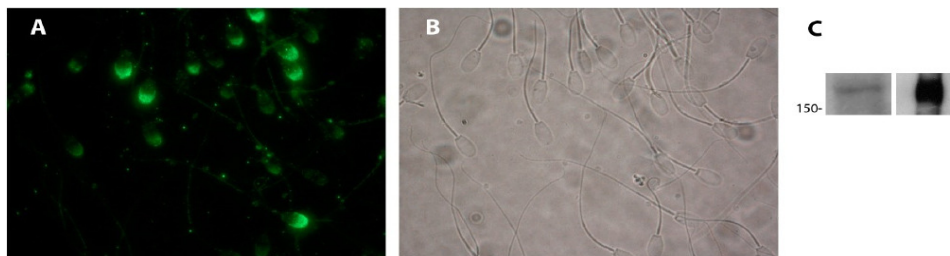


Figura 1. Localización del EGFR por inmunofluorescencia indirecta (A) Imagen de fluorescencia, (B) Imagen de campo claro (1000x). (C) Membranas de western blot indicando la presencia de EGFR en lisados de células espermáticas (1) y controles positivos de un lisado de células estimuladas con EGF (Upstate, Millipore).

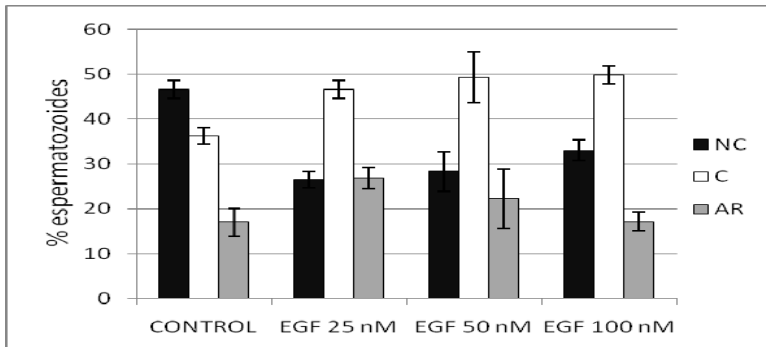


Figura 2. Efecto del EGF en el estado de capacitación de espermatozoides, evaluado por la tinción con clorotetraciclina (patrón CTC). No capacitados ■; Capacitados □; Acrosoma reaccionado ▒. (Porcentaje \pm desviación estándar; control, $n=19$; 25 nM EGF, $n=3$; 50 nM EGF, $n=3$; 100 nM EGF, $n=3$).

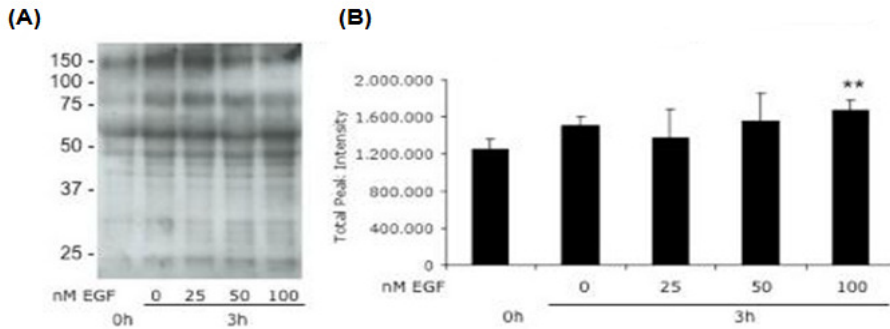


Figura 3. (A) Efecto del EGF en la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina evaluado mediante western blot y (B) cuantificación densitométrica. ** Diferencia significativa ($P < 0.01$) relativa al control de capacitación, a las 3 h de incubación. Valores medios \pm desviación estándar (control, $n=19$; 25 nM EGF, $n=3$; 50 nM EGF, $n=3$; 100 nM EGF, $n=3$).

THE EPIDERMAL GROWTH FACTOR IS INVOLVED IN RAM SPERM *IN VITRO* CAPACITATION THROUGH MAP KINASES PATHWAY

ABSTRACT: Unlike most other species, ram spermatozoa are difficult to capacitate *in vitro*. We have previously shown that an artificial increase of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) in the TALP medium stimulated ram sperm capacitation. Here we report, for the first time, the presence of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in ram spermatozoa and that EGF significantly stimulates ram sperm capacitation and protein tyrosine phosphorylation. Also, EGF seems to play an important role in hyperactivated motility of spermatozoa during capacitation. Our findings might benefit our understanding of the biochemical mechanisms involved in the process of capacitation in sheep and, ultimately, fertility.

Keywords: ram sperm, capacitation, EGF, fertilization.