

## EFFECTO DE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS EN LA LOCALIZACIÓN Y LOS NIVELES DE CALCIO INTRACELULAR DURANTE LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA OVINA

Gimeno-Martos, S., Miguel-Jiménez, S., Casao, A., Cebrián-Pérez, JA., Muño-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.

Email: 711778@unizar.es

### INTRODUCCIÓN

El calcio intracelular ( $\text{Ca}^{2+}$ ) juega un papel muy importante en la regulación de la capacitación espermática y la reacción acrosómica (RA) (rev. en Breitbart (2000)). Durante la capacitación espermática, se ha observado un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en la mayoría de las especies (Baldi et al., 1991; White et al., 1989; Colas et al., 2010), que puede ser debido a la entrada de calcio desde el exterior o a la salida del mismo desde los reservorios intracelulares. La capacitación tiene lugar en el tracto reproductor femenino, donde el espermatozoide está expuesto a diferentes hormonas, entre las que se encuentran las hormonas esteroideas progesterona ( $\text{P}_4$ ) y  $17\text{-}\beta$  estradiol ( $\text{E}_2$ ). Nuestro grupo de investigación ha estudiado la acción de estas hormonas sobre la capacitación del espermatozoide ovino, donde, entre otras acciones, provocan un incremento de los espermatozoides reaccionados (Gimeno-Martos et al., 2017). En cuanto a su relación con el calcio, se ha descrito que la  $\text{P}_4$  produce cambios en su distribución durante la capacitación y la RA en espermatozoides humanos y de ratón (Harper et al., 2004; Romarowski et al., 2016) mientras que  $\text{E}_2$  lo aumenta ligeramente (Luconi et al., 1999). Hasta la fecha, no hay estudios sobre el efecto de estas hormonas sobre el  $\text{Ca}^{2+}$  durante la capacitación espermática ovina. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el posible efecto regulador de la progesterona y  $17\text{-}\beta$  estradiol sobre los niveles y la localización del calcio intracelular en los espermatozoides ovinos durante la capacitación.

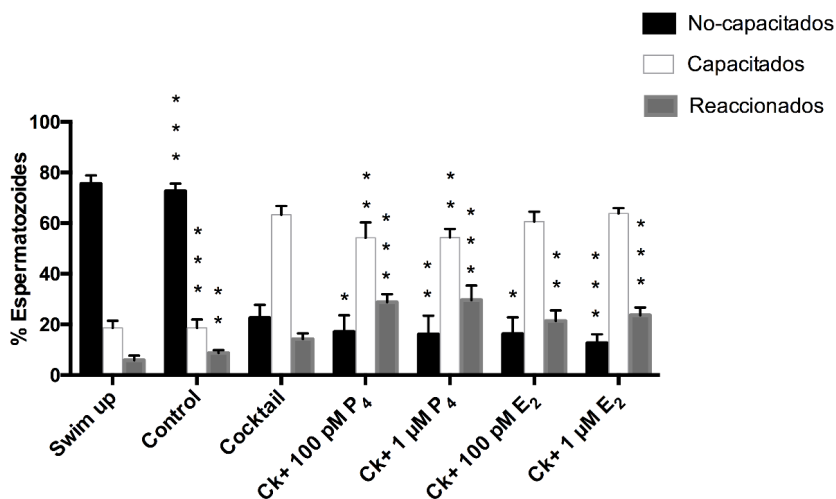
### MATERIAL Y MÉTODOS

El semen utilizado se obtuvo mediante vagina artificial a partir de moruecos pertenecientes a la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Ovino Selecto de 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-Lopez et al., 1996) para obtener una población espermática libre de plasma seminal. Para inducir la capacitación espermática *in vitro*, alícuotas de  $1,6 \times 10^8$  céls/ml obtenidas tras *swim-up* se diluyeron en medio TALP (control) (Parrish et al. 1988) con una mezcla de sustancias (*cocktail*, *ck*) con capacidad de inducir la capacitación *in vitro* de los espermatozoides ovinos (Colas et al. 2008), y se mantuvieron a  $39^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  y 100% de humedad relativa durante 3 horas. Para determinar el efecto de las hormonas esteroideas durante la capacitación, a las muestras *cocktail* se les añadió  $\text{P}_4$  y  $\text{E}_2$  a concentraciones 100 pM y 1  $\mu\text{M}$ . Además, a las muestras control y *cocktail* se les añadió DMSO a la misma concentración utilizada para diluir las hormonas (1/1000). Para evaluar el proceso de capacitación, las muestras se tiñeron con clorotetraciclina (CTC) y se diferenciaron tres subtipos de espermatozoides bajo el microscopio de fluorescencia (no capacitados, capacitados y los que han sufrido la RA) (Grasa et al., 2006). Se analizaron los niveles de calcio intracelular por citometría de flujo tras tinción con Fluo-4-AM (sonda con gran afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ ) y IP (yoduro de propidio) (Gee et al., 2000). Además se estudió su localización en los distintos reservorios intracelulares mediante microscopía de fluorescencia usando Rhod-5N-AM (sonda con baja afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ ). El análisis estadístico se llevó a cabo con el software Gradpad InStat (5.01, San Diego, CA, EEUU).

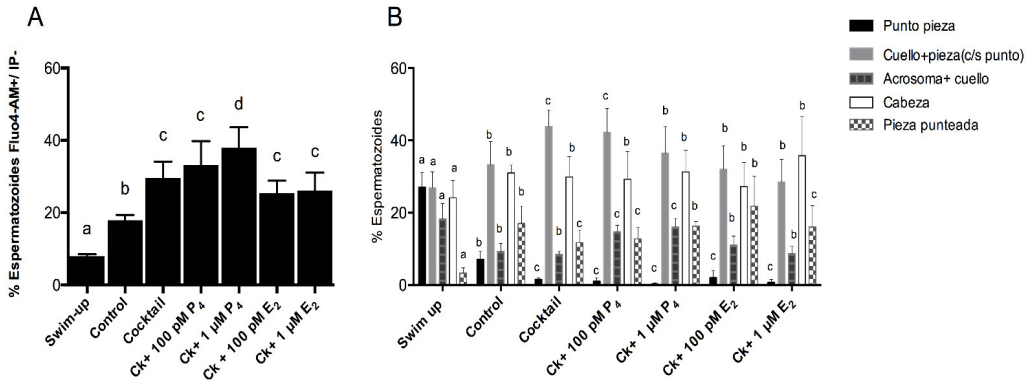
### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como era esperable, la presencia del *cocktail* de sustancias que inducen la capacitación aumentó significativamente el porcentaje de espermatozoides capacitados en comparación con la muestra control (incubada en TALP en las mismas condiciones) ( $P < 0,001$ , Fig 1). Este incremento fue concomitante con un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $P < 0,001$ , Fig. 2A). La inclusión de ambas hormonas a las dos concentraciones ensayadas dio lugar a un aumento

significativo de los espermatozoides reaccionados en comparación con la muestra *cocktail* ( $P < 0,01$ , Fig 1), pero sólo la  $P_4$  a  $1\mu\text{M}$  provocó un incremento significativo en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Fig 2A;  $P < 0,05$ ). Este resultado coincidiría con estudios previos realizados en otras especies como el cerdo (Yeste et al., 2015) y el macaco (Sumigama et al., 2015). Por otro lado, el uso de Rhod-5N-AM permitió identificar diferentes patrones de tinción en el espermatozoide ovino en función de la localización del  $\text{Ca}^{2+}$  en distintos compartimentos intracelulares. En las muestras control antes de la capacitación (*swim-up*) se observó un alto porcentaje de la subpoblación de espermatozoides que presentaban solamente un punto de intensa fluorescencia al final de la pieza intermedia, subpoblación que disminuyó significativamente en las muestras capacitadas control, llegando casi a desaparecer en las muestras *cocktail* ( $P < 0,001$ , Fig. 2B). En estas últimas, la subpoblación predominante fue la que presentaba marcaje conjunto en cuello y en pieza intermedia ( $43,86 \pm 4,53\%$ ). Sin embargo, la incubación con hormonas esteroideas disminuyó significativamente este porcentaje ( $36,5 \pm 7,31$ ,  $32,0 \pm 6,75$  y  $28,5 \pm 6,12\%$ ;  $P < 0,05$  para  $P_4$   $1\mu\text{M}$  y  $P < 0,001$  para  $100$  pM y  $1\mu\text{M}$   $\text{E}_2$ ). Además, la presencia de  $P_4$  a ambas concentraciones provocó un aumento del porcentaje de espermatozoides marcados en la zona acrosomal respecto a la muestra *cocktail* ( $P < 0,001$ , Fig 2B). La incubación con  $\text{E}_2$  no tuvo ningún efecto significativo sobre la localización del  $\text{Ca}^{2+}$  en esa zona, pero incrementó el marcaje irregular en la zona intermedia ( $\text{E}_2$   $100$  pM,  $P < 0,001$ , Fig 2B). Estos resultados revelan que, a pesar de que tanto como la  $P_4$  como el  $\text{E}_2$  dan lugar a un incremento en el porcentaje de espermatozoides reaccionados según la tinción de CTC, sólo la  $P_4$  provoca un aumento en los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  y una movilización de este ión hacia el acrosoma durante la capacitación.



**Figura 1.** Porcentaje de espermatozoides según el estado de capacitación evaluado por tinción con clorotetraciclina (CTC) (No capacitados ■; Capacitados □; Acrosoma reaccionado ▒) en muestras seleccionadas por swim-up y muestras incubadas en condiciones capacitantes en medio TALP (control), TALP + sustancias capacitantes (cocktail, ck) con y sin progesterona y  $17\text{-}\beta$  estradiol. Valores medios  $\pm$  SEM ( $n=4$ ). \*\* ( $P < 0,001$ ) y \*\*\* ( $P < 0,0001$ ):diferencias significativas respecto a la muestra cocktail sin hormonas.



**Figura 2.** Porcentaje de espermatozoides vivos con alta concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Fluo-4AM+/IP-), evaluados por citometría de flujo (panel A) y porcentaje de los diferentes patrones de distribución de Ca<sup>2+</sup> (Rhod-5N-AM) por microscopía de fluorescencia (panel B) en muestras seleccionadas por swim-up y incubadas en condiciones capacitantes en medio TALP (control), TALP + sustancias capacitantes (cocktail, ck) con y sin progesterona y 17-β estradiol. Valores medios ± SEM (n=4). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (P < 0,005).

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Baldi, E., et al.1991. J. Androl.12:323-330. • Breitbar H., 2002. Mol. Cell Endocrinol. 187:139-144. • Colas, C., et al. 2008. Reprod. Fert. Dev. 20:649-658. • Colas, C., et al. 2010. Int. J. Androl. 33:187-197. • Garcia-Lopez, N., et al.1996. Theriogenology 46: 141-151. • Gee, KR., et al. 2000. Cell Calcium 27:97-106 • Gimeno-Martos, S., et al. 2017. Reproduction 154:469-481. • Grasa, P., et al. 2006. Reproduction. 132:721-732. • Harper, CV., et al. 2004. 279:46315-46325 • Luconi, M., et al. 1999. J. Clin. Endocrinol. Metab. 84:1670-1678 • Ollero, M., et al. 1996. Int. J. Androl. 19:287-292. • Parrish, J., et al. 1988. Biol. Reprod. 38:1171-1180. • Romarowski, A., et al. 2016. Biol. Reprod. 94:63. • Sumigama, S., et al. 2015 Biol. Reprod. 96:130 • White, DR., et al.1989. Gamete Res. 22:163-177. • Yeste, M., et al. 2015 Andrology 3:729-747 •

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

### EFFECT OF STEROID HORMONES IN THE LOCALIZATION AND LEVELS OF INTRACELLULAR CALCIUM DURING RAM SPERM CAPACITATION

**ABSTRACT:** Progesterone (P<sub>4</sub>) and 17-β estradiol (E<sub>2</sub>) are hormones that are present in the female genital tract, and also regulate sperm capacitation. The aim of this study was to evaluate the effect of these hormones on intracellular calcium levels and distribution during ovine sperm capacitation. Ram spermatozoa were selected by swim-up, diluted in a high-cAMP medium (cocktail) and incubated in capacitating conditions during 3 hours with or without 100 pM or 1 μM of P<sub>4</sub> or E<sub>2</sub>. After capacitation, calcium levels were analyzed with Fluo-4AM and PI by flow cytometry, whereas the location of intracellular calcium were analysed with Rhod-5N-AM by fluorescence microscopy. Our results revealed that, although both P<sub>4</sub> and E<sub>2</sub> gave rise to an increase in the percentage of spermatozoa reacted according to CTC staining, only P<sub>4</sub> led an increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> levels and a mobilization of this ion to the acrosome during ram sperm capacitation.

**Keywords:** Spermatozoa, intracellular calcium, steroid hormones, capacitation.