RECEPTORES DE PROGESTERONA Y ESTRÓGENO β EN EL ESPERMATOZOIDE OVINO Y SU CORRELACIÓN CON LA CAPACITACIÓN

González-Arto, M., Casao, A.,Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T. y Cebrián-Pérez, J.A.
Dpto. Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), Facultad de Veterinaria, Zaragoza. España.
martagonzalezarto@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La progesterona y los estrógenos juegan un papel fundamental en la diferenciación, maduración y funcionalidad espermática, sobre todo en la capacitación (Baldi et al., 2009). Trabajos previos de nuestro grupo pusieron de manifiesto la presencia del receptor de estrógeno β (ERβ) en el espermatozoide ovino, distinguiéndose tres inmunotipos relacionados con la distribución celular de este receptor (Casao et al., 2011). Por otra parte, el receptor de progesterona (PR) se ha identificado en algunas especies (Wu et al., 2005; De Amicis et al., 2012), aunque no en la especie ovina. Dado que los procesos de capacitación y reacción acrosómica involucran cambios en la membrana y redistribución molecular, se puede hipotetizar que la distribución de los receptores para dichas hormonas varíe, lo que explicaría los distintos inmunotipos identificados previamente. Para comprobar esta hipótesis, el primer objetivo de este estudio fue determinar la presencia del receptor de progesterona en la membrana del espermatozoide ovino, para, posteriormente estudiar la posible variación en la distribución de dicho receptor, junto con el ERβ, en los distintos estados fisiológicos ligados a la capacitación en el espermatozoide de esta especie.

MATERIAL Y METODOS

En todas las experiencias se empleó semen ovino obtenido mediante vagina artificial a partir de moruecos adultos, pertenecientes a la Asociación Nacional de Ganaderos de la raza *Rasa Aragonesa* (ANGRA), mantenidos en las instalaciones del Servicio de Apoyo a la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza. Los espermatozoides se separaron del plasma seminal por el método de swim-up/dextrano, grupo S (García-López et al., 1996). La capacitación espermática *in vitro*(grupo C) se indujo diluyendo muestras (1,6 x 10^8 células/ml) en medio TALP completo, con 5 mg/ml de BSA, al que se añadió un *cocktail*para la capacitación *in vitro* de espermatozoides ovinos (Colás et al., 2008). Las muestras se incubaron en 5% de CO_2 y 100% de humedad relativa, a 39ºC durante 3 h. La reacción acrosómica(grupo R) se indujo añadiendo lisofosfatidilcolina (LPC, 300 μg/ml(Gómez et al., 1997) a las muestras previamente capacitadas, incubando durante 20 min más en las mismas condiciones. El estado de capacitación se evaluó mediante la tinción con clorotetraciclina (CTC) combinada con homodímerode etidio(Pérez-Pé et al., 2002).

La inmunolocalización de los receptores de progesterona y la determinación de los inmunotipos de ERβ en los distintos grupos experimentales se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta. Para ello, alícuotas de las muestras de espermatozoides ($2x10^6$células/ml) se fijaron con 3,7% paraformaldehído (v/v) durante 20 min a temperatura ambiente (TA), y posteriormente se bloquearon incubándolas 2 h con 5% BSA (peso/volumen) a temperatura ambiente (TA) en PBS. Posteriormente, las muestras se incubaron con anticuerpos “rabbit anti-PG” y “rabbit anti-ERβ” (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, U.S.A), diluidos 1/50 en PBS con 1% BSA durante toda la noche a 4ºC en cámara húmeda. A continuación, las muestras se lavaron tres veces con PBS y se incubaron de nuevo con un anticuerpo secundario (Alexa Fluor 488 chicken-antirabbit, en dilución 1/800 en PBS con 1% BSA) durante 1 h y 15 min a TA y en oscuridad. Finalmente, las muestras se montaron en portaobjetos y se observaron con un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400, Tokio, Japón). Los resultados se expresaron en porcentaje y se analizaron mediante el test de chi-cuadrado, mientras que la correlación entre los inmunotipos respecto a ERβ y el estado de capacitación espermática se realizó mediante el test de correlación de Pearson. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS (SPSS *software*, versión 15.0).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ensayos de inmunofluorescencia mostraron por primera vez la presencia del receptor de progesterona en espermatozoides ovinos. Se observó un único patrón de marcaje con

fluorescencia en la región ecuatorial que no presentó el control negativo sin anticuerpo primario (Figura 1). Este patrón se encontró en todas las células y se mantuvo invariable independientemente del estado de capacitación. Sin embargo, la distribución del Erβ mostró una marcada variación en función de los distintos grupos experimentales (Tabla 1); en concreto, su presencia en la región apical fue disminuyendo tras la capacitación y la reacciónacrosómica (P<0,001). Debido a estas diferencias, analizamos la posible correlación entre la distribución del ERβ y los diferentes estados de capacitación determinada por la tinción con CTC/EtHd. El análisis estadístico mostró una elevada correlación positiva entre la presencia del ERβ en la zona apical del espermatozoide y el porcentaje de espermatozoides no capacitados (r=0.848; P<0.001) (Figura 2). En la introducción comentan que ya habían detectado ERβ en espermatozoides ovinos y habían relacionado distintos inmunotipos con la localización celular (Casao, 2011).

En los últimos años se han descrito gran cantidad de efectos no genómicos de las hormonas esteroideas llevados a cabo a través de receptores de membrana (Luconi et al., 2004). Una de las posibles acciones de la progesterona sería estimular diferentes funciones del espermatozoide, tales como motilidad hiperactivada, capacitación, quimiotaxis y la reacción acrosómica, mientras que el 17-β estradiol podría tener un efecto inhibidor sobre la inducción de la reacción acrosómica por parte de la progesterona, favoreciendo de ese modo una correcta sincronización del proceso. Hay especies en que la capacitación puede ser inducida por la progesterona (Baldi et al., 2009), mientras que en otras es el estradiol el agente responsable (Ded et al., 2013). Los resultados de este estudio evidencian que la presencia del ERβ en la región apical del espermatozoide ovino se relaciona con un menor de grado de capacitación, lo cual sugiere que podría ser el estradiol la hormona que mediase en el proceso de capacitación del espermatozoide ovino, aunque todavía son necesarios más estudios para confirmarlo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

• Baldi, E., Luconi, M., Muratori, M., Marchiani, S., Tamburrino, L. Forti, G. 2009. *Mol. Cell. Endocrinol.* 308: 39-46. • Casao, A., Gallego, M., Perez-Pe, R., Muino-Blanco, T. Cebrian-Perez, J. 2011.*Reprod. Domest. Anim.* 46: 93-93.• Colás, C., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T. Cebrián-Pérez, J. A. 2009. *Reprod. Domest. Anim.*44: 221-227. • De Amicis, F., Santoro, M., Guido, C., Sisci, D., Bruno, R., Carpino, A. Aquila, S. 2012. *Anim. Reprod. Sci.* 135: 75-84. • Ded, L., Sebkova, N., Cerna, M., Elzeinova, F., Dostalova, P., Peknicova, J. Dvorakova-Hortova, K. 2013. *Reproduction*. • Garcia-Lopez, N., Ollero, M., Muino-Blanco, T. Cebrian-Perez, J. A. 1996.*Theriogenology* 46: 141-151.• Gómez, M. C., Catt, J. W., Gillan, L., Evans, G. Maxwell, W. M. C. 1997.*Reprod. Fertil. Dev.* 9. • Luconi, M., Francavilla, F., Porazzi, I., Macerola, B., Forti, G. Baldi, E. 2004.*Steroids* 69: 553-559.• Perez-Pe, R., Grasa, P., Fernandez-Juan, M., Peleato, M. L., Cebrian-Perez, J. A. Muino-Blanco, T. 2002.*Mol. Reprod. Dev.* 61: 226-233. • Wu, J., Tsai, P., Lee, S. Cheng, F. 2005.*Reprod. Fertil. Dev.* 17: 733-741.

Agradecimientos: CICYT-FEDER AGL2010-18975, DGA A26FSE y Gobierno Vasco (BFI-2010-229 MOD:AE). Los autores agradecen a ANGRA el suministro de sementales.

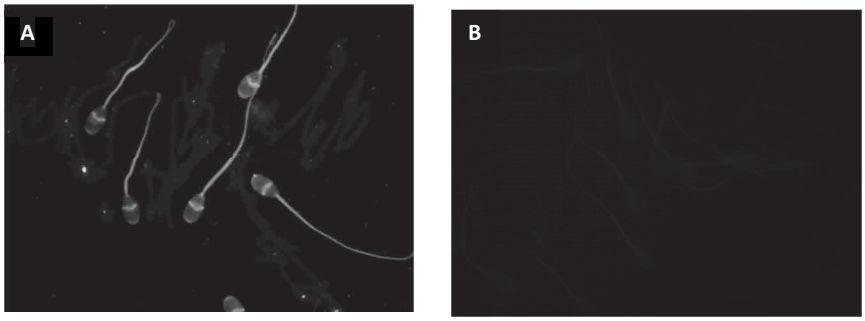


Figura 1. *Inmunolocalización del receptor de progesterona en el espermatozoide ovino por inmunofluorescencia indirecta (A) y control negativo. (B).*

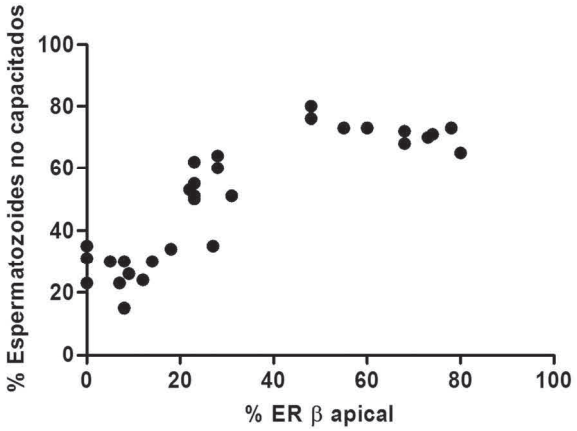


Figura 2. *Correlación entre la presencia del ERβ en la zona apical del acrosoma del espermatozoide ovino, determinada por inmunofluorescencia y el porcentaje de espermatozoides no capacitados vivos, evaluada por la tinción con clorotetraciclina(CTC)*

Tabla 1. *Porcentaje de espermatozoides que presentan marcaje apical para ERβ y los distintos estados de capacitación en espermatozoides procedentes de un swim-up (grupo S), sometidos a una capacitación in vitro (grupo C) y posteriormente a una reacción acrosómica (grupo R). Resultados expresados como media ± SEM (n=10). Letras distintas en la misma columna indican P<0,05.*

	% ERβ	Estado de capacitación		
		No capacitados	Capacitados	Reaccionados
Grupo S	65,20 ± 3,74%[a]	72,10 ± 1,30%[a]	18,40 ± 1,48%[a]	9,20 ± 1,03%[a]
Grupo C	24,60 ± 1,20%[b]	51,50 ± 3,22%[b]	30,90 ± 3,06%[b]	18,1 ± 0,67%[b]
Grupo R	6,30 ± 1,59%[c]	26,70 ± 1,80%[c]	27,90 ± 0,86%[c]	45,4 ± 1,26%[c]

PROGESTERONE RECEPTOR AND ESTROGEN RECEPTORβ IN RAM SPERMATOZOA AND THEIR CORRELATION WHITH THE CAPACITATION STATE

ABSTRACT: Progesterone and estradiol play an important role in sperm function, especially in sperm capacitation, and these actions are likely receptor mediated. We have previously shown the presence of estrogen receptorβ (ERβ) in ram spermatozoa, with three different inmunotypes. However, there are no reports on progesterone receptor (PR) in this species. Given that capacitation and the acrosome reaction involve sperm membrane changes and molecular redistribution, it can be hypothesized that the receptor distribution of these hormones can be modified. Thus, in this study we investigated the presence of progesterone receptor (PR) in ram spermatozoa, and analyzedthe distribution of both PR and ERβ in different physiological states associated with ram sperm capacitation. Using immunofluoresce techniques, we identified for the first time PR in ram spermatozoa, located in the equatorial region. Moreover, our results showed that PR distribution remained independent of the samples' capacitation state. However, ERβ distribution varied depending on the capacitation state. A high positive correlation between the presence of ERβin the acrosomal apical zone and the rate of non-capacitated spermatozoa (r=0.848; P<0.001) was found. These results suggest that ERβ could be involved in ram sperm capacitation.

Keywords: Spermatozoa, capacitation, progesterone receptor, estrogen receptorβ