

EFFECTO DEL 17- β ESTRADIOL Y LA PROGESTERONA SOBRE LA CAPACITACIÓN Y LA CAPACIDAD FECUNDANTE DEL ESPERMATOZOIDE OVINO

Casao, A., Gimeno-Martos, S., Abecia, J.A., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T. y Pérez-Pé, R.

Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), Facultad de Veterinaria, Miguel Servet 177, Zaragoza. adriana@unizar.es

INTRODUCCIÓN

Para poder ser capaz de fecundar al ovocito, el espermatozoide debe llevar a cabo una serie de eventos conocidos como capacitación. La capacitación espermática es un proceso complejo y no del todo conocido, que conlleva cambios en la membrana plasmática del espermatozoide, movimientos de calcio intracelular y una serie de cascadas de transducción de señales que concluyen con la reacción acrosómica del espermatozoide (Yanagimachi, 1994). Todos estos procesos ocurren de forma fisiológica en el tracto genital de la hembra, por lo que no hay duda de que factores presentes en ese ambiente, como las hormonas esteroideas (estrógenos, en concreto 17- β estradiol (E2) y progesterona (P4) podrían tener un papel importante en su modulación (ver revisión de Baldi et al. (2009)).

En los últimos años se ha especulado que todas estas posibles acciones de las hormonas esteroideas en el espermatozoide se produzcan a través de receptores específicos de membrana. En el caso de la especie ovina, en la que apenas hay estudios sobre el efecto de las hormonas esteroideas sobre el espermatozoide, nuestro grupo ha detectado la presencia de receptores de estrógeno β (Casao et al., 2011) y de progesterona (González-Arto et al., 2013) en la membrana espermática. De esta manera, las hormonas esteroideas (17- β estradiol y progesterona) podrían estar involucradas en los procesos de capacitación y en la capacidad fecundante del espermatozoide ovino.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el análisis del efecto de 17 β estradiol y progesterona sobre el espermatozoide ovino se partió de semen obtenido el mismo día de la fecundación in vitro mediante vagina artificial partir de moruecos adultos, pertenecientes a la Asociación Nacional de Ganaderos de la raza Rasa Aragonesa (ANGRA), mantenidos en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza. Los espermatozoides se separaron del plasma seminal por el método de swim-up/dextrano (García-Lopez et al., 1996) y se capacitaron in vitro a una concentración de $1,6 \times 10^8$ céls/ml en medio TALP completo (Parrish et al., 1988), con 5 mg/ml de albúmina sérica bovina, en condiciones capacitantes (5% de CO₂ y 100% de humedad relativa, a 39 °C durante 3 horas). Las muestras espermáticas se incubaron con 17- β estradiol 1 μ M (muestra E2), progesterona 1 μ M (muestra P4) o sin hormonas esteroideas (control). Tras la incubación se analizó motilidad, viabilidad, estado de capacitación y capacidad fecundante de las muestras.

La evaluación de la motilidad se realizó mediante un sistema de análisis computerizado (ISAS 1.0.4; Proiser SL, Valencia, Spain). La determinación de la viabilidad (integridad de la membrana plasmática) se llevó a cabo mediante la doble tinción con diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) y yoduro de propidio (IP) y se analizó por citometría de flujo. La valoración del estado de capacitación se llevó a cabo mediante la tinción con clorotetraciclina (CTC), y se analizó mediante microscopía de fluorescencia.

La capacidad fecundante de las muestras se evaluó por fecundación in vitro (FIV). Los ovocitos se obtuvieron a partir de ovarios procedentes de ovejas adultas que se ovariectomizaron en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza el día anterior a la obtención de los espermatozoides, y se maduraron siguiendo el protocolo habitual (Casao et al., 2017). A las 22-24 horas del inicio de la maduración, los ovocitos se denudaron pipeteándolos varias veces suavemente, se lavaron dos veces en medio de fecundación (SOF (Tervit y Whittingham, 1972) sin glucosa con un 2% de suero fetal bovino), y se colocaron en un pocillo con 350 μ l de dicho medio. Tras la incubación con hormonas, los espermatozoides se añadieron a los ovocitos a una concentración final de 10^6 células/ml y los gametos se incubaron durante 24 horas a 39°C y 5% de CO₂. A las 24 y 48 horas tras la fecundación se identificaron los embriones divididos, que se cultivaron a 39°C, 5% de CO₂ y 5% de O₂ durante 8 días (contando como día 0 el

momento de la fecundación *in vitro*) según el protocolo habitual (Casao et al., 2017). Los ovocitos no divididos se tiñeron con Hoechst 33342 para evaluar su estado de maduración. Los datos obtenidos se analizaron mediante chi-cuadrado, utilizando el programa IBM SPSS Statistics 21 (IBM, Armonk, NY, Estados Unidos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El uso de estradiol o progesterona no produjo diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides móviles o móviles progresivos cuando se comparó con la muestra control (Tabla 1), aunque se apreció un aumento significativo de la motilidad progresiva de la muestra tratada con estradiol cuando se comparó con la tratada con progesterona ($P < 0,05$). Estos resultados concuerdan con los observados en hámster (Jin et al., 2005) y en caballo (Filannino et al., 2011), en los que el estradiol mejora los parámetros de motilidad en estas especies. En cuanto a la viabilidad espermática (Tabla 1), se observó una mejora de este parámetro en ambas muestras incubadas con hormonas, aunque solo fue significativa en presencia de P4 ($P < 0,05$), de forma similar a la observada en trabajos realizados con espermatozoides porcinos (De Amicis et al., 2012).

Los análisis del estado de capacitación, evaluado por CTC, revelaron que la incubación con ambas hormonas disminuyó el porcentaje de espermatozoides no capacitados, a la vez que aumentó el de capacitados (Figura 1) y en el caso de la progesterona, también el de reaccionados. Estos resultados corroboran los obtenidos en otras especies, en los que el estradiol parece favorecer los procesos de capacitación en espermatozoides humanos (Adeoya-Osiguwa et al., 2003) y porcinos (Ded et al., 2010), mientras que la progesterona ha demostrado un efecto capacitante, e inductor de la reacción acrosómica en la mayor parte de mamíferos (ver revisiones de Baldi et al. (2009) y Witte y Schäfer-Somi (2007)).

A pesar de este aumento del porcentaje de espermatozoides capacitados la adición de hormonas esteroideas *in vitro* a los espermatozoides ovinos no se reflejó en su capacidad fecundante, evaluada mediante FIV, ya que no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos fecundados, divididos a las 24 o 48 horas de la fecundación, ni tampoco en el porcentaje de blastocistos obtenidos (Tabla 2). Estos resultados difieren de los obtenidos en hámster (Libersky y Boatman, 1995) o porcino (Barboni et al., 1995) en el caso de la progesterona, y en ratón (Adeoya-Osiguwa et al., 2003) en el caso del estradiol, donde estas hormonas mejoraban la capacidad fecundante evaluada mediante unión a zona pelúcida o pruebas de penetración. En nuestro caso, es probable que el tiempo de co-incubación de los gametos (24 horas) en el medio de fecundación, que incluye bicarbonato en su composición, con cierto efecto capacitante (Grasa et al., 2006), haya hecho que las diferencias apreciadas en el estado de capacitación de las muestras espermáticas no se reflejen en el resultado final de la FIV.

En conclusión, la adición de $17\text{-}\beta$ estradiol y progesterona a los espermatozoides ovinos aumentó el porcentaje de espermatozoides capacitados, pero este aumento no se reflejó en una mejora de los embriones obtenidos mediante FIV.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adeoya-Osiguwa, S. A., et al. 2003. Hum. Reprod. 18: 100-107.
- Baldi, E., et al. 2009. Mol. Cell. Endocrinol. 308: 39-46.
- Barboni, B., et al. 1995. Journal of Endocrinology 144: 13-18.
- Casao, A., et al. 2011. Reprod. Domest. Anim. 46: 93-93.
- Casao, A., et al. 2017. Zygote 25: 98-102.
- De Amicis, F., et al. 2012. Anim. Reprod. Sci. 135: 75-84.
- Ded, L., et al. 2010. Reprod. Biol. Endocrinol. 8: 87.
- Filannino, A., et al. 2011. Reprod. Biol. Endocrinol. 9: 134.
- García-Lopez, N., et al. 1996. Theriogenology 46: 141-151.
- González-Arto, M., et al. 2013. XV Jornadas sobre Producción Animal de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (AIDA), Zaragoza, Spain.
- Grasa, P., et al. 2006. Reproduction 132: 721-732.
- Jin, W., et al. 2005. J. Androl. 26: 478-484.
- Libersky, E. A. Boatman, D. E. 1995. Biol. Reprod. 53: 483-487.
- Parrish, J. J., et al. 1988. Biol. Reprod. 38: 1171-1180.
- Tervit, H. R. Whittingham, D. G. 1972. J. Reprod. Fert. 30: 493 - 497.
- Witte, T. S. Schäfer-Somi, S. 2007. Anim. Reprod. Sci. 102: 181-193.
- Yanagimachi, R. 1994. Zygote 2: 371-372.

Agradecimientos: AGL2013-41200-P, AGL2014-57863-R, BES2015-072034 y DGA-A26

Tabla 1. Motilidad, motilidad progresiva y viabilidad de espermatozoides incubados con 1 μM de 17- β estradiol (E2), 1 μM de progesterona (P4) o sin hormonas (Control). Los resultados se muestran como media \pm SEM de $n = 3$. Letras distintas indican diferencias significativas ($P > 0,05$).

	Motilidad	Motilidad progresiva	Viabilidad
Control	62,6 \pm 11,5 %	22,0 \pm 4,1 %	40,0 \pm 4,2 % ^a
E2	65,0 \pm 14,1 %	27,7 \pm 4,0 % ^a	46,5 \pm 4,5 %
P4	63,1 \pm 11,9 %	20,3 \pm 2,6 % ^b	48,1 \pm 6,2 % ^b

Tabla 2. Tasas de maduración, fecundación, división y de blastocistos de ovocitos fecundados con espermatozoides incubados con 1 μM de 17- β estradiol (E2), 1 μM de progesterona (P4) o sin hormonas (Control).

	Maduración	Fecundación	División 24 h	División 48 h	Blastocistos
Control (n=68)	83,8 %	86,0 %	38,2 %	66,2 %	33,3 %
E2 (n=64)	79,7 %	94,1 %	37,5 %	71,9 %	39,1 %
P4 (n=67)	80,6 %	87,0 %	46,3 %	68,7 %	34,4 %

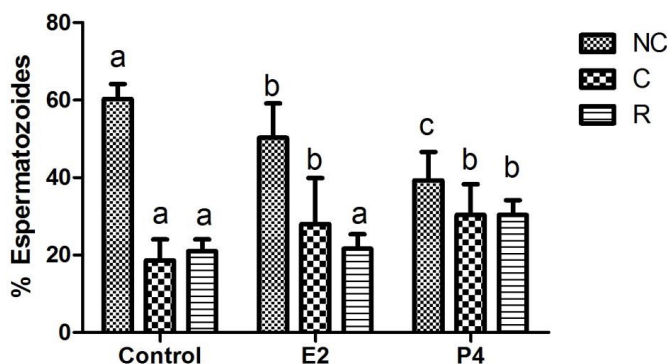


Figura 1. Porcentaje de espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (C) y reaccionados (R), evaluados mediante la tinción con clorotetraciclina (CTC), en muestras incubadas con 1 μM de 17- β estradiol (E2), 1 μM de progesterona (P4) o sin hormonas (Control). Los resultados se muestran como media \pm SEM de $n = 3$. Letras distintas indican diferencias significativas ($P > 0,05$).

17- β ESTRADIOL AND PROGESTERONE EFFECT ON RAM SPERM CAPACITATION AND FERTILIZING ABILITY

ABSTRACT: Steroid hormones (17- β estradiol and progesterone) are present in the female reproductive tract. Also, receptors for both hormones are present in ram spermatozoa. In order to determine the effect of these hormones, ram spermatozoa, selected by swim-up were incubated with 1 μM of 17- β estradiol or progesterone in TALP medium and capacitating conditions. Estradiol increased the progressive motility ($P < 0.05$) after incubation, whereas progesterone improved the sperm viability ($P < 0.05$). Both hormones decreased the non-capacitated sperm rate and increased the percentage of capacitated sperm ($P < 0.05$), and progesterone also increased the acrosome-reacted sperm rate ($P < 0.05$). However, no differences were found in the fertilizing, cleavage or blastocyst rate when treated spermatozoa were used in IVF procedures. In conclusion, steroid hormones can stimulate *in vitro* ram sperm capacitation and the acrosome reaction.

Keywords: Spermatozoa, FIV, steroid hormones.