



Mecanismos que regulan la fecundación en
mamíferos: Modulación de la quimiotaxis
espermática en bovinos mediada por acetato de
ulipristal y zinc.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas

Tesinista: Argiel, Agostina Daniela

Firma

Director: Dr. Guidobaldi, Héctor Alejandro

Firma

CENTRO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
CEBICEM - 2018

Mecanismos que regulan la fecundación en
mamíferos: Modulación de la quimiotaxis
espermática en bovinos mediada por acetato de
ulipristal y zinc.

Tribunal Examinador:

Apellido y Nombre: Dra. Giojalas, Laura

Firma

Apellido y Nombre: Dra. Franchi, Anahí

Firma

Apellido y Nombre: Dr. Baiardi, Gustavo

Firma

Calificación:

Fecha:

Índice	Pág.
Resumen	3
Introducción.....	5
Objetivos.....	11
Materiales y Métodos	12
Consideraciones éticas.....	12
Reactivos y medios de cultivo	12
Obtención y preparación de los espermatozoides.....	12
Evaluación de la quimiotaxis por medio de un ensayo de acumulación	14
Determinación del porcentaje de acumulación espermática en el W2	14
Determinación de parámetros cinéticos.....	15
Análisis Estadístico.....	15
Resultados.....	16
Verificación de la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides bovinos a progesterona.....	16
Verificación de la respuesta quimiorepelente de los espermatozoides humanos al acetato de ulipristal	17
El acetato de ulipristal induce quimioatracción en espermatozoides bovinos <i>in vitro</i> .	18
El acetato de ulipristal no modifica los parámetros cinéticos de los espermatozoides bovinos.....	19
El acetato de ulipristal inhibe la quimioatracción inducida por la progesterona en espermatozoides bovinos	21
El zinc induce quimioatracción en espermatozoides bovinos <i>in vitro</i>	23
El zinc no modifica los parámetros cinéticos de los espermatozoides bovinos	24
El zinc no afecta la quimioatracción inducida por la progesterona en espermatozoides bovinos.....	26
Discusión	28
Bibliografía.....	32
Agradecimientos.....	36

“Mecanismos que regulan la fecundación en mamíferos: Modulación de la quimiotaxis espermática en bovinos mediada por acetato de ulipristal y zinc”.

Palabras Clave:

QUIMIOTAXIS, PROGESTERONA; ACETATO DE ULIPRISTAL; ZINC.

Resumen

Para que ocurra la fecundación en mamíferos se tiene que producir el encuentro y fusión de las gametas femenina y masculina. Distintos mecanismos, como la quimiotaxis, guían a los espermatozoides en su viaje por el tracto reproductor femenino, para facilitar el encuentro del ovocito. Las células del cumulus que rodean al ovocito secretan progesterona que se difunde formando un gradiente de concentración que orienta y atrae activamente a los espermatozoides aptos para fecundar. Sin embargo, luego de ocurrida la fecundación, es necesario evitar la fusión de otros espermatozoides con el ovocito (poliespermia), ya que en mamíferos, conllevaría a la degeneración y muerte del embrión.

Recientemente se ha propuesto a la quimiorepulsión como un mecanismo que permitiría un bloqueo rápido de la poliespermia. Al respecto, se ha caracterizado el efecto de sustancias análogas a la progesterona, como el acetato de ulipristal (UPA) y de cationes bivalentes como el zinc. El UPA es un compuesto sintético que actúa como un modulador selectivo del receptor de progesterona y se utiliza mundialmente como un método anticonceptivo de emergencia; en cambio, el zinc, es un micronutriente natural que se almacena activamente en vesículas debajo de la membrana plasmática del ovocito, que son rápidamente excitadas luego de la fecundación. Se ha demostrado que, un gradiente de concentración de UPA o de zinc repele espermatozoides de humano, ratón y conejo en condiciones *in vitro*. Sin embargo, lo que resulta interesante es que, la presencia de alguno de estos compuestos convierte al gradiente atrayente de progesterona en quimiorepelente. Este mecanismo podría estar operando *in vivo* como un primer bloqueo de la poliespermia.

Para poder estudiar y caracterizar este mecanismo de conversión es necesario emplear un modelo animal que permita realizar ensayos de fecundación *in vitro* como parte del diseño experimental. En este sentido, el modelo de bovino se presenta como el más adecuado ya que las gametas se pueden obtener comercialmente y sin necesidad de sacrificar los animales sólo para tal fin, como ocurre en conejos o ratones.

Dado que no se ha caracterizado la respuesta quimiorrepelente en bovinos, el objetivo del presente proyecto fue determinar si la orientación espermática en esta especie es regulada por el UPA y el zinc cuando están en forma de un gradiente de concentración y, establecer si su presencia en el medio puede regular la orientación mediada por la progesterona. Para ello, los espermatozoides bovinos capacitados se enfrentaron a distintas concentraciones de UPA o zinc en ensayos de selección espermática. A partir de estos experimentos se observó que el UPA induce quimioatracción en espermatozoides bovinos y que la presencia de esta sustancia inhibe el efecto quimioatractante de la progesterona. También se observó que un gradiente de zinc induce quimioatracción en bovinos. Sin embargo, la presencia de este catión no inhibe la quimioatracción mediada por la progesterona e incluso podría estimularla. En conclusión, en espermatozoides congelados/descongelados de bovinos el UPA y el zinc actúan como quimioatractantes, a diferencia de lo reportado hasta el momento en otras especies de mamíferos.

Introducción

La regulación del proceso de fecundación es un evento complejo y trascendental en la vida de los animales, ya que, de este depende el desarrollo de un nuevo ser vivo y la preservación de las especies en el tiempo.

Dependiendo de la especie, la fecundación puede ocurrir en entornos completamente diferentes; ya sea en ambientes acuáticos como ocurre en invertebrados marinos y peces de fecundación externa, o bien, dentro del tracto reproductor femenino como en mamíferos. En estos últimos, los espermatozoides son depositados en la vagina o en el útero y son transportados rápidamente hasta el oviducto, donde forman un “reservorio espermático” adhiriéndose al epitelio en la región del istmo (Suarez, 2002) (Fig. 1A). Allí, los espermatozoides completan la capacitación, un proceso fisiológico que comprende una serie de cambios biofísicos y bioquímicos, que los prepara para fecundar al ovocito (De Jonge, 2005). Una vez capacitados, los espermatozoides se liberan del epitelio y migran hacia el sitio de fecundación (unión istmo-ámpula). Sin embargo, el encuentro de las gametas no es un evento azaroso, debido a que ocurre en un entorno complejo por la morfología del oviducto (Fig. 1B; Yániz y col., 2000) y la distancia hasta el sitio de fecundación es considerablemente grande.

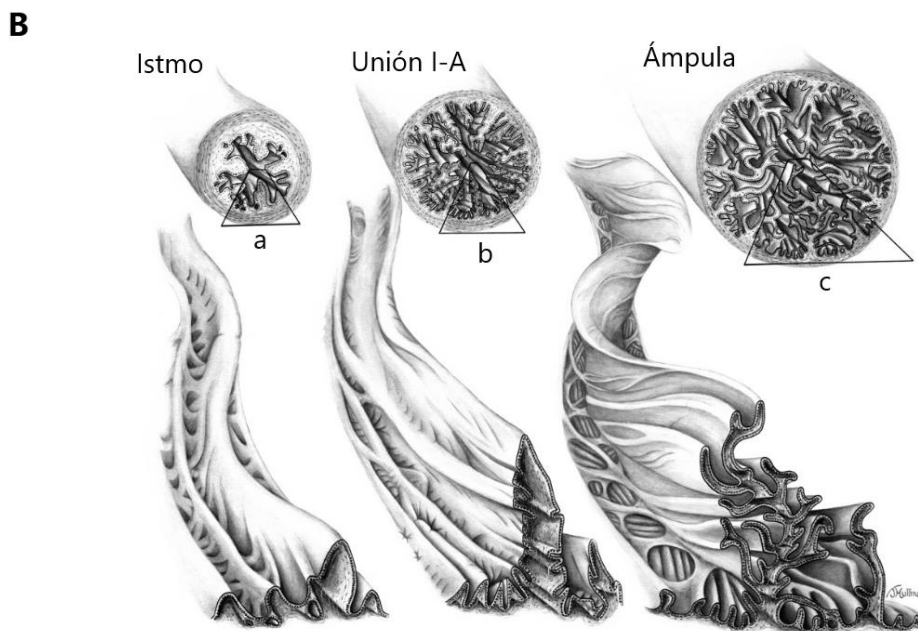
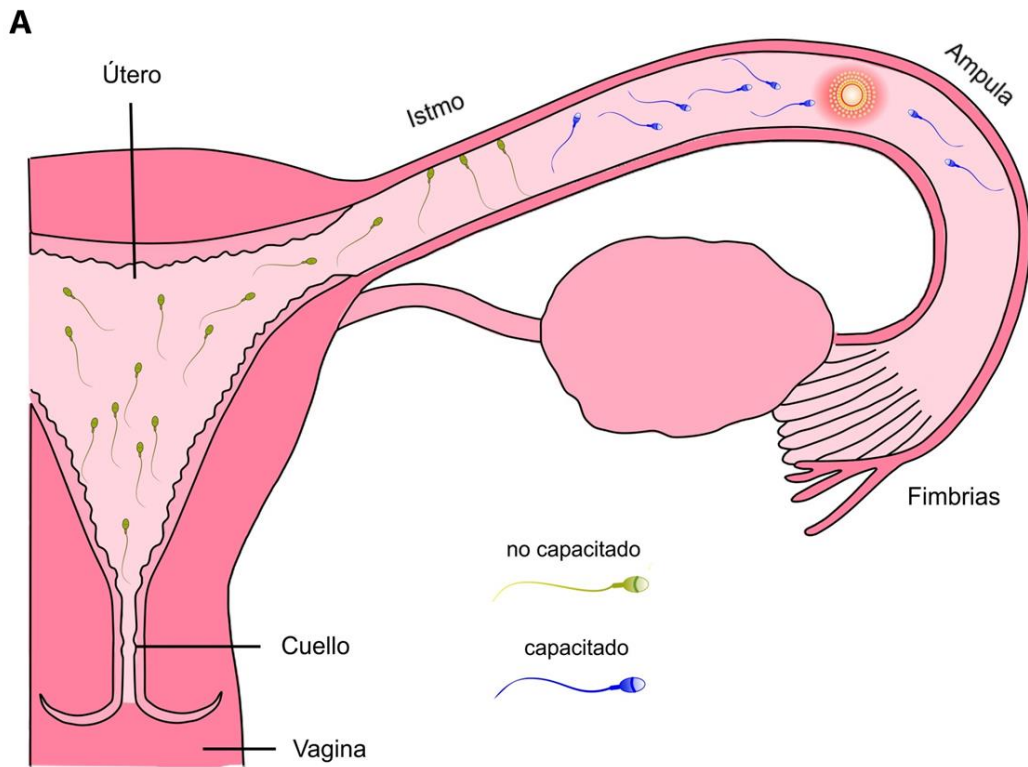


Figura 1. Representación del transporte espermático en el aparato reproductor femenino. A) Esquema general del aparato reproductor femenino indicando las distintas regiones de este, a la vez que se representa el estado fisiológico de los espermatozoides (verde: no capacitados; azul: capacitados) durante su viaje hacia el sitio de fecundación; modificado de la tesina de Biól. Victoria Molino. B) Representación de un corte transversal y longitudinal de las regiones del istmo (a), unión istmo-ámpula (b) y ámpula (c), modificado de Yaniz y col., 2000 *The Anatomical Record*; 260:268-278.

En este contexto, se han descrito diversos mecanismos de transporte que facilitan el encuentro entre las gametas. Algunos, son propios del tracto reproductor femenino, como las contracciones oviductales que provocan el movimiento en masa de los espermatozoides que están nadando en el seno del fluido oviductal (Guidobaldi y col., 2012; Ito y col., 1991). En tanto que otros mecanismos guían de manera específica sólo a aquellos espermatozoides que están capacitados como la termotaxis (Bahat, 2003), la reotaxis (Miki & Clapham, 2013) y particularmente la quimiotaxis (Giojalas y col., 2015; Guidobaldi y col., 2012) (Fig. 2).

La quimiotaxis, es la orientación del movimiento de una célula siguiendo un gradiente de concentración de una sustancia química (Giojalas y col., 2015). Puede ser positiva cuando las células son orientadas a favor del gradiente de concentración de la sustancia, “quimioatracción” (Eisenbach, 2004); o puede ser negativa, cuando las mismas se alejan de la fuente de la sustancia, y se denomina “quimiorepulsión” (Eisenbach, 2004).

Diversas moléculas han sido propuestas como atractantes de espermatozoides (Giojalas y col., 2015). Entre ellas, la progesterona tiene relevancia fisiológica debido a que luego de la ovulación es secretada por las células del cumulus que rodean al ovocito (Guidobaldi y col., 2008; Oren-Benaroya y col., 2008; Teves y col., 2006) y se difunde formando un gradiente de concentración más allá del cumulus (Guidobaldi y col., 2008; Teves y col., 2006). Además, se ha demostrado *in vitro* que concentraciones picomolares de progesterona inducen quimioatracción en espermatozoides capacitados de humano, conejo, ratón, bovino y equino (Dominguez y col., 2018; Gatica y col., 2013; Guidobaldi y col., 2008; Oren-Benaroya y col., 2008; Teves y col., 2006).

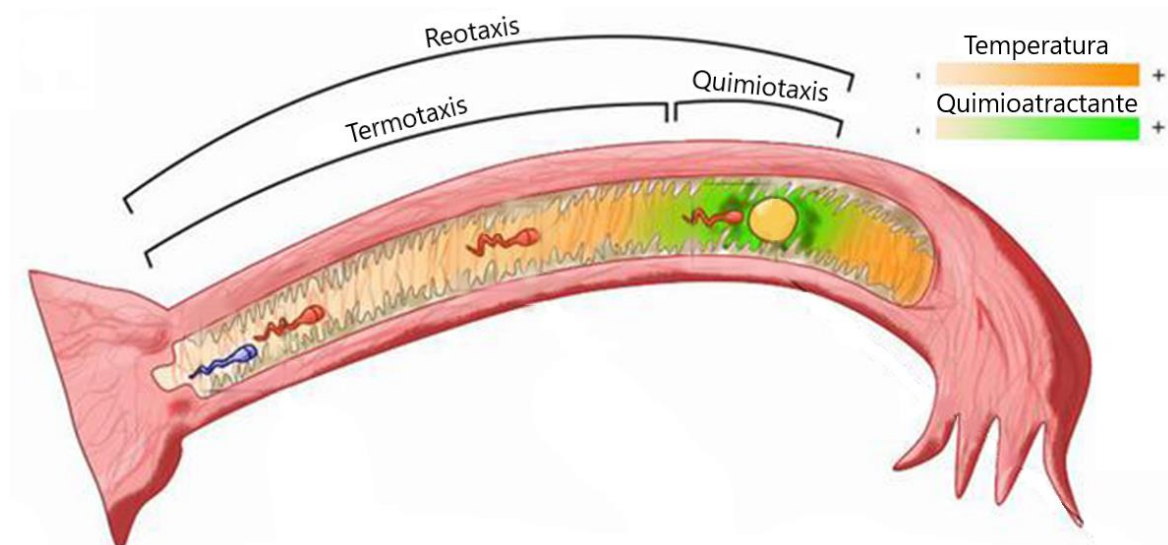


Figura 2. Esquema de la trompa de Falopio. Representación de los distintos mecanismos de transporte espermático y su posible rango de acción. Modificado de Lottero-Leconte y col., 2017. *Translational Cancer Research*; 6: S427-S430.

Por otro lado, recientemente, se ha identificado que los espermatozoides de humano, conejo y ratón pueden ser repelidos *in vitro*, por un gradiente de concentración de algunos compuestos esteroideos análogos a la progesterona y por el catión de zinc (Guidobaldi y col., 2017). Los compuestos esteroideos identificados como quimiorepelentes fueron acetato de ulipristal (UPA), mifepristona y levonorgestrel, los cuales se emplean comúnmente como anticonceptivos de emergencia (Bouchard y col., 2011). El UPA es uno de los anticonceptivos de emergencia no hormonales más eficaces y recientemente más difundido en el mundo (Brache y col., 2013; Glasier y col., 2010). Es un compuesto sintético (Fig. 3) que actúa como un modulador selectivo del receptor de progesterona (SPRM) pudiendo tener efecto agonista y/o antagonista (Chabbert-Buffet y col., 2005) dependiendo de distintos factores, entre ellos de la presencia o ausencia de progesterona. Su mecanismo de acción como anticonceptivo aún es poco conocido y algo controvertido (Chabbert-Buffet y col., 2005; Rosato y col., 2016); si bien se sabe que su principal función es la inhibición o el retraso de la ovulación (Brache y col., 2010; Nallasamy y col., 2013), el UPA podría además actuar a otros niveles, por ejemplo, afectando la función espermática (Wilcox y col., 1996). En las mujeres que toman UPA como anticonceptivo de emergencia, los espermatozoides pueden estar expuestos a ciertas concentraciones de este SPRM antes de alcanzar el ovocito (Munuce y col., 2012). Estudios recientes, indican que el UPA en concentraciones micro-molares no tiene efecto en los espermatozoides en cuanto a la movilidad, vitalidad, integridad del ADN, capacitación, reacción acrosómica e hiperactivación (Ko y col., 2014). Sin embargo, se ha demostrado que un gradiente de concentración de UPA induce quimiorepulsión en espermatozoides de humano, conejo y ratón (Guidobaldi y col., 2017). Lo que resulta más interesante aún es que, la presencia del UPA puede convertir el gradiente attractante de progesterona en quimiorepelente (Guidobaldi y col., 2017). Además, se ha observado que el UPA suprime de manera dosis dependiente la reacción acrosómica y la hiperactivación inducida por progesterona en los espermatozoides (Ko y col., 2014).

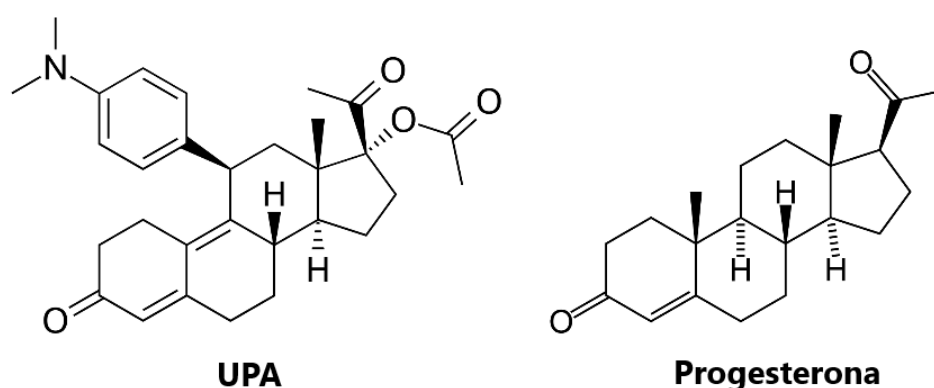


Figura 3. Fórmula estructural del acetato de ulipristal (UPA) y la progesterona.

En cuanto al zinc, se sabe que es un micronutriente que cumple un rol fundamental en el mantenimiento de diversos procesos fisiológicos y celulares en mamíferos (Maret, 2013), como el desarrollo, crecimiento, diferenciación (Kim y col., 2010), síntesis de proteínas, señalización (Kochańczyk y col., 2015) y apoptosis (Chimienti y col., 2001). El zinc es además un catión esencial para la función reproductiva tanto femenina como masculina. Dentro del tracto reproductor masculino se encuentra en concentraciones muy elevadas (Foresta y col., 2014; Vallee & Falchuk, 1993) incorporándose a los espermatozoides desde las primeras etapas de diferenciación en el testículo (Kruczynski y col., 1985) hasta la eyaculación (Björndahl y col., 1986). Posteriormente, para que ocurra la fecundación, se ha demostrado que es necesaria la eliminación de zinc de los espermatozoides durante el proceso de capacitación (Andrews y col., 1994; Kerns y col., 2018). Por otro lado, este ion también es muy importante para las funciones reproductoras femeninas, como la ovulación y la activación ovocitaria (Kaki, 2001; Kim y col., 2010). En el ovocito, el zinc se almacena activamente en vesículas ubicadas debajo de la membrana plasmática durante la maduración, y las mismas son rápidamente excitadas luego de la fecundación (Kim y col., 2011; Que y col., 2017). Recientemente, se ha demostrado que el zinc también puede inducir quimiorrepulsión en espermatozoides humanos capacitados cuando está formando un gradiente de concentración (Guidobaldi y col., 2017). Pero además, también puede regular la respuesta quimioattractante de la progesterona convirtiéndola en quimiorrepelente (Guidobaldi y col., 2017). Esto sugiere que el zinc, podría regular el proceso de fecundación induciendo la quimiorrepulsión espermática luego de la unión de las gametas, evitando así la poliespermia (Guidobaldi y col., 2017).

La poliespermia es la fusión de dos o más espermatozoides con un ovocito y, en la mayoría de los mamíferos es una condición patológica que conlleva a la degeneración y muerte del embrión. Se han descrito algunos mecanismos que la previenen como: 1) la reacción cortical, que involucra la exocitosis de gránulos corticales del ovocito luego de ser fecundado, donde las sustancias liberadas alteran la zona pelúcida evitando que los espermatozoides puedan atravesarla (Gardner & Evans, 2006); 2) la exocitosis de micro-vesículas de origen ovocitario (Saavedra y col., 2014) y 3) la remoción de la proteína Juno de la membrana del ovocito que participa en la fusión con el espermatozoide (Bianchi y col., 2014). Sin embargo, estos mecanismos son lentos y demoran entre 30 min y 2 h en ser efectivos. En este sentido, la quimiorrepulsión podría funcionar como un mecanismo rápido para el bloqueo de la poliespermia, que evitaría la llegada de los espermatozoides capacitados que están siendo reclutados activamente para fecundar al ovocito.

Para el estudio de la poliespermia, es necesario realizar experimentos de fecundación, por lo que su análisis está limitado a ciertos modelos animales. En humanos hay limitaciones éticas y legales en tanto que, en conejos y ratones es necesario sacrificar a los animales sólo para obtener quirúrgicamente los ovocitos. En este sentido, el modelo de bovino se presenta como una alternativa factible para el estudio de la poliespermia. Dado que, los ovocitos se pueden extraer de ovarios obtenidos en un matadero y los espermatozoides se pueden obtener a partir de muestras de semen congelado disponible comercialmente. Además, los ovocitos bovinos pueden fecundarse en condiciones *in vitro* (Parrish y col., 1986) lo que permitiría estudiar eventos pre- y post-fecundación.

Por otro lado, se ha demostrado recientemente que los espermatozoides de bovino congelados/descongelados pueden ser quimioatraídos hacia la progesterona en condiciones *in vitro* (Dominguez y col., 2018). Sin embargo, se desconoce si el UPA y/o el zinc, pueden orientar quimiotácticamente a los espermatozoides bovinos. Así como también, se desconoce si la presencia de estas sustancias puede modular la forma en que los espermatozoides bovinos responden a la presencia de un gradiente de concentración de progesterona. De acuerdo con los antecedentes en otras especies de mamíferos, se propone la siguiente hipótesis: *“El acetato de ulipristal y el zinc pueden orientar a los espermatozoides cuando están en forma de un gradiente de concentración y su presencia en el medio puede regular la orientación mediada por la progesterona.”*

Objetivo General

“Determinar si la orientación espermática en bovinos es regulada por el acetato de ulipristal y el zinc cuando están en forma de un gradiente de concentración, y establecer si su presencia en el medio puede regular la orientación mediada por la progesterona”.

Objetivos Específicos

1) *Determinar si los espermatozoides de bovino pueden ser orientados por un gradiente de concentración de acetato de ulipristal.* En otras especies de mamíferos, se ha reportado que el acetato de ulipristal puede inducir quimiorrepulsión espermática. Por lo tanto, se evaluará el efecto del acetato de ulipristal en la orientación de espermatozoides de bovino congelados/descongelados mediante un ensayo de quimiotaxis *in vitro*.

2) *Determinar el efecto del acetato de ulipristal en la quimioatracción mediada por un gradiente de progesterona en bovinos.* El acetato de ulipristal puede actuar como agonista o antagonista del receptor de progesterona y, en otras especies, se ha observado que su presencia puede convertir un gradiente de progesterona en quimiorrepulente; por lo tanto, se evaluará si los espermatozoides de bovino congelados/descongelados pueden ser quimiorrepelidos por un gradiente de progesterona en presencia de acetato de ulipristal mediante un ensayo de quimiotaxis *in vitro*.

3) *Determinar si los espermatozoides de bovino pueden ser orientados por un gradiente de concentración de zinc.* En condiciones *in vitro*, se ha observado que el zinc cuando está en forma de gradiente puede inducir quimiorrepulsión en espermatozoides de humanos. Por lo tanto, se evaluará el efecto del zinc en la orientación de espermatozoides de bovino congelados/descongelados mediante un ensayo de quimiotaxis *in vitro*.

4) *Determinar el efecto del zinc en la quimioatracción mediada por un gradiente de progesterona en bovinos.* El zinc es liberado por los ovocitos en ratones, luego de la fecundación. En humanos se ha demostrado que podría actuar como un regulador fisiológico de la quimiorrepulsión modulando la actividad quimioattractante de la progesterona convirtiéndola en quimiorrepulente; por lo tanto, se evaluará si los espermatozoides de bovino congelados/descongelados pueden ser quimiorrepelidos por un gradiente de progesterona en presencia de zinc homogéneo mediante un ensayo de quimiotaxis *in vitro*.

Materiales y Métodos

Consideraciones Éticas. El uso de gametas masculinas de bovino no requiere de la aprobación de un comité de ética ya que no se mantendrán animales y se emplearán muestras de semen congelados obtenidos comercialmente a empresas habilitadas para tal fin. El uso de muestras humanas contó con la aprobación del comité de Ética del Hospital Nacional de Clínicas (Universidad Nacional de Córdoba #06/10/E). Las muestras fueron tratadas de acuerdo con la declaración de Helsinki, previo consentimiento informado por escrito de los participantes.

Reactivos y medios de cultivo. Todos los reactivos empleados fueron adquiridos a la empresa Sigma-Aldrich (St. Lois, EE. UU.). Como medio de cultivo para separar y capacitar a los espermatozoides de bovino se utilizó el medio Sp-TALP (Parrish y col., 1988) el cual está compuesto por NaCl 100 mM, KCl 3,1 mM, NaHCO₃ 25 mM, NaH₂PO₄ 0,3 mM, lactato de sodio 21,6 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 0,4 mM, piruvato de sodio 1 mM, a pH 7,4, suplementado con HEPES 10 mM, albúmina sérica bovina al 0,3% y gentamicina 50 µg/ml.

Como medio de cultivo para separar y capacitar los espermatozoides humanos se utilizó el medio formulado por Biggers, Whitten y Whittingham (Biggers y col., 1971) que está compuesto por NaCl 95 mM, KCl 4,8 mM, CaCl₂ 1,3 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 25 mM, lactato de sodio 20 mM, glucosa 5mM, piruvato de sodio 0,25 mM, a pH 7,4, suplementado con HEPES 45 mM y albúmina sérica bovina al 3%.

Obtención y preparación de los espermatozoides.

Los espermatozoides de bovino se obtuvieron a partir de muestras de semen comercial congelado, provenientes de toros de probada fertilidad y se mantuvieron en nitrógeno líquido (-196°C) hasta el momento de utilizarlas. Las muestras contenidas en pajuelas se descongelaron durante 30 segundos a 38,5°C en un baño termostatzado. Luego, se cortó la pajuela por un extremo y se recuperó el semen descongelado en un tubo tipo eppendorf. Los espermatozoides se separaron del plasma seminal y el crio-protector con la técnica de migración sedimentación (Tea y col.,1984). La cámara de separación de espermatozoides (Fig. 4) se cargó con 1 ml de medio de cultivo iniciando la carga en el tubo interior; luego, se colocaron 200 µl de semen por fuera del tubo interior y se incubó durante 90 min en estufa gaseada con 5% de CO₂ y a 38,5°C. De esta manera, los espermatozoides nadan fuera del semen y migran al tubo interior dónde inician la capacitación espermática. Luego del período de incubación, se recuperó el contenido del tubo interior y se determinó la concentración de espermatozoides mediante una cámara

Neubauer. Para ello, se tomó una alícuota de 20 μl de la solución de espermatozoides y se le agregó 180 μl de agua destilada, para detener el movimiento de estos. Luego se colocaron 10 μl de la solución en la cámara de Neubauer y se contaron los espermatozoides en toda la cuadrícula central de la misma en un microscopio de contraste de fase a 400x (Olympus CX41, Tokio, Japón). Este procedimiento se repitió por lo menos 3 veces. El promedio de espermatozoides en la cámara central se multiplicó por 100.000 (factor de dilución $\times 10.000$) para determinar la concentración espermática, ajustándose luego a 2×10^6 espermatozoides/ml en medio sp-TALP.

Los espermatozoides humanos se obtuvieron a partir de muestras de semen de donantes voluntarios obtenidas por masturbación, con un período de abstinencia sexual de entre 48 y 120 h. Sólo se utilizaron aquellas muestras consideradas normales según el criterio de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010). Los espermatozoides se separaron del plasma seminal con la técnica de migración-sedimentación (Tea y col.,1984) durante 60 min, en estufa gaseada con 5% de CO_2 y a 37°C utilizando medio BWW. Una vez recuperados los espermatozoides se evaluó el porcentaje de células móviles utilizando una cámara Mackler a 37°C y se determinó la concentración celular en la cámara de Neubauer. Finalmente, con el fin de inducir la capacitación espermática, los espermatozoides se incubaron durante 4 horas posteriores a la separación del plasma seminal a una concentración de 6×10^6 espermatozoides/ml en estufa gaseada con 5% de CO_2 y a 37°C .

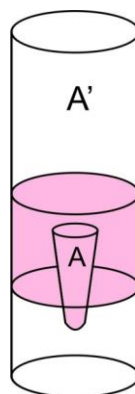


Figura 4. Cámara de separación de espermatozoides por migración-sedimentación. La cámara está constituida por dos compartimientos donde se siembra el semen (A') y donde se recuperan los espermatozoides (A). La cámara se llena con medio de cultivo indicado en color rosa.

Evaluación de la quimiotaxis por medio de un ensayo de acumulación. Para evaluar la orientación de los espermatozoides inducida por un gradiente de concentración se empleó el Ensayo de Selección Espermática (ESE) (Gatica y col., 2013; Guidobaldi y col., 2017). La cámara del ESE está formada por dos compartimientos unidos por un puente de 2 mm. Los espermatozoides se colocaron en el compartimiento 1 (W1) y las sustancias a evaluar (progesterona, UPA o zinc) se colocaron en el compartimiento 2 (W2). De esta manera, las sustancias forman un gradiente de concentración por difusión pasiva en el tubo conector (TC) entre ambos compartimientos (Fig. 5).

En bovinos, la cámara se incubó por 10 min en estufa gaseada con 5% de CO₂ a 38,5°C. Luego, se recuperó la solución del W2 y se determinó la concentración de células acumuladas. Como control negativo, se colocó en el W2 medio de cultivo. En espermatozoides humanos se llevó a cabo el mismo procedimiento, pero se incubó la cámara del ESE por 20 min en estufa gaseada con 5% de CO₂ a 37°C.

En el caso de que las sustancias induzcan quimioatracción, se espera encontrar un incremento en la cantidad de células acumuladas en el W2 respecto del control negativo. Por el contrario, en caso de inducir quimiorepulsión, se espera una disminución significativa respecto del control negativo.

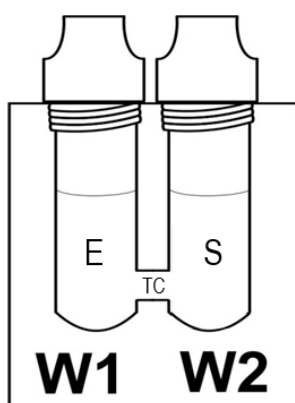


Figura 5. Cámara de Selección Espermática. E, espermatozoides; S, sustancia a evaluar (Progesterona, UPA o zinc); TC, tubo conector; W1 y W2, compartimiento 1 y 2.

Determinación del porcentaje de acumulación espermática en el W2. La población espermática recuperada del W2 se fijó con formol al 1% por 20 min a temperatura ambiente y luego se determinó la concentración de espermatozoides recuperados utilizando una cámara de Neubauer, en un microscopio de contraste de fase a 400x (Olympus CX41, Tokio, Japón).

Luego, se determinó el porcentaje de recuperación espermática de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración de espermatozoides en W2}}{\text{Concentración inicial de espermatozoides en W1}} \times 100$$

Para determinar el porcentaje de acumulación de espermatozoides inducida por el tratamiento, se aplicó la siguiente la fórmula:

$$\% \text{ Acumulación} = \% \text{ Recuperación}_{\text{TRATAMIENTO}} - \% \text{ Recuperación}_{\text{CONTROL NEGATIVO}}$$

Determinación de parámetros cinéticos. La determinación de parámetros cinéticos (velocidad y tipo de movimiento) se realizó por medio de video microscopía y análisis de imágenes (Mortimer & Swan, 1995). Para ello, se colocaron 10 μl de la suspensión de espermatozoides en un portaobjeto templado a 38,5°C en una platina térmica, y se cubrió la gota con un cubreobjetos. Se sellaron los bordes con vaselina para evitar posibles flujos debido al ingreso de aire. Las muestras se observaron en un microscopio invertido de contraste de fase Nikon Ti-S (Nikon Instruments Inc., New York, USA) a 100x y se registró el movimiento espermático con una cámara digital Nikon Ds-Qil mediante el software NIS-elements Br 3.06 (Nikon Instruments Inc., New York, EE. UU.). Las grabaciones se realizaron durante 5 segundos a 30 Hz de frecuencia, con una resolución de 640x480 pixeles. Las trayectorias de los espermatozoides se determinaron con el programa FIJI (Schindelin y col., 2012), mediante el plug in Particle Tracker (Chenouard y col., 2014; Sbalzarini & Koumoutsakos, 2005) y los parámetros cinéticos se evaluaron con la macro paNoel 1.0.0 (Universidad Nacional de Córdoba; http://www.iibyt.conicet.unc.edu.ar/files/AG-paNoel-1.0.0.ijm_.zip).

Análisis estadístico. Las diferencias entre tratamientos se establecieron mediante el análisis de la varianza (ANAVA), a menos que se especifique lo contrario en el pie de la figura. Las diferencias se consideraron significativas con un nivel de confianza $P < 0,05$. Para todos los análisis se probaron los supuestos de normalidad. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa “InfoStat” (Di Rienzo y col., 2011).

Resultados

Verificación de la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides bovinos a progesterona.

La progesterona induce quimioatracción *in vitro* en espermatozoides de humano (10 pM) (Oren-Benaroya y col., 2008), conejo y ratón (100 pM) (Guidobaldi y col., 2008; Teves y col., 2006). Recientemente, Domínguez y col. han reportado que los espermatozoides de bovino también responden quimiotácticamente hacia la progesterona a una concentración 1 pM. Por lo tanto, realizamos un ensayo dosis respuesta para verificar la concentración de progesterona óptima a la que responden quimiotácticamente los espermatozoides de bovino a los fines de emplearla como control positivo. Para ello, se realizó el ESE empleando espermatozoides bovinos capacitados y se evaluó el porcentaje de acumulación espermática inducido por distintas concentraciones de progesterona (10, 1 y 0,1 pM). Como control negativo, se empleó medio de cultivo sp-TALP.

En la Figura 6 se observa que hubo un incremento significativo en el porcentaje de espermatozoides acumulados en presencia de progesterona; siendo la concentración 1 pM la de mayor respuesta, coincidentemente con lo reportado previamente (Dominguez y col., 2018). Además, se observa que la respuesta tiene forma de campana, lo cual es característico de la respuesta quimiotáctica (Adler, 1973). A partir de estos resultados, en los siguientes experimentos se estableció la concentración 1 pM de progesterona como control positivo de quimioatracción en espermatozoides de bovino.

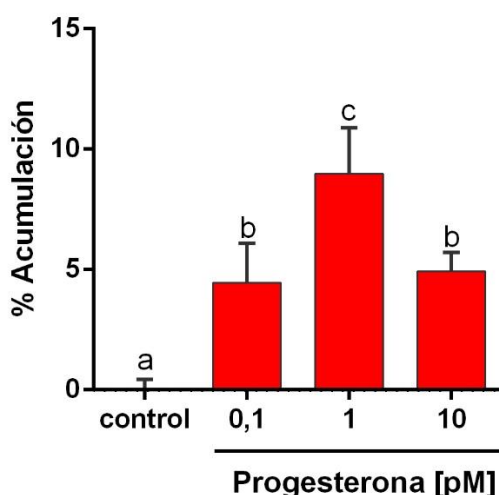


Figura 6. Los espermatozoides de bovino responden quimiotácticamente a la progesterona. Porcentaje de acumulación de espermatozoides en el W2 de la cámara del ESE respecto de la media del control negativo de sp-TALP (control). Los resultados están expresados como la media \pm E.E. de 3 experimentos independientes. Letras minúsculas iguales (a, b, c) indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos.

Verificación de la respuesta quimiorepelente de los espermatozoides humanos al acetato de ulipristal.

Recientemente se reportado que el UPA induce quimiorepulsión en espermatozoides de humano, conejo y ratón (Guidobaldi y col., 2017). Por lo tanto, decidimos verificar el efecto quimiorepelente del UPA en espermatozoides humanos mediante el ESE, para emplearlo como un control positivo de quimiorepulsión. Para ello, evaluamos el efecto de un gradiente ascendente de UPA (210 pM) y el efecto del UPA homogéneo (210 pM) en presencia de un gradiente de concentración de progesterona (10 pM). En paralelo, se realizó un control negativo empleando medio de cultivo BWW y un control positivo de quimioatracción empleando progesterona 10 pM (Guidobaldi et al., 2017).

En la figura 7 se observa que, tal como se ha reportado previamente, la presencia de un gradiente ascendente de UPA induce quimiorepulsión. En tanto que, el gradiente de progesterona que normalmente es atractante, en presencia del UPA homogéneo se convierte en quimiorepelente (P grad + UPA homo).

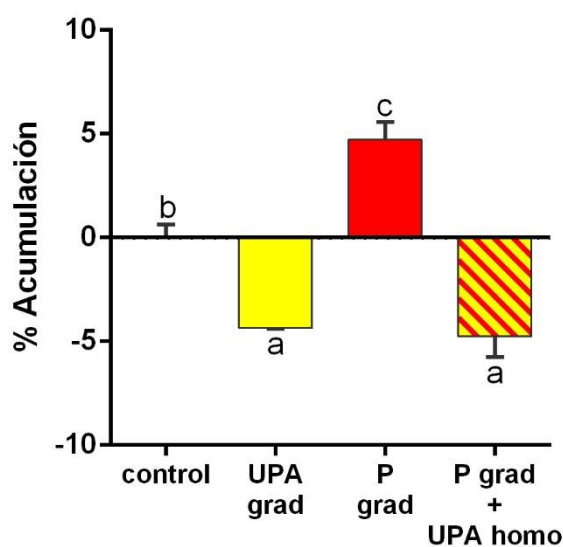


Figura 7. El acetato de ulipristal induce quimiorepulsión en los espermatozoides humanos. Efecto en la orientación espermática inducido por un gradiente ascendente de UPA 210 pM (UPA grad), un gradiente ascendente de progesterona 10 pM (P grad) y un gradiente de progesterona 10 pM en presencia de UPA 210 pM distribuido homogéneamente (P grad + UPA homo). Los resultados están expresados como la media \pm E.E. de 3 de experimentos independientes. Letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos.

El acetato de ulipristal induce quimioatracción en espermatozoides bovinos *in vitro*.

Habiendo verificado la acción del UPA en humanos, procedimos a evaluar si los espermatozoides de bovino capacitados *in vitro* pueden ser orientados por el UPA. Para ello se realizó el ESE evaluando el porcentaje de acumulación espermática inducido por distintas concentraciones de UPA. En paralelo, se realizó un control negativo empleando medio de cultivo sp-TALP en el W2 y un control positivo de quimioatracción empleando progesterona 1 pM.

En la figura 8, se observa que en presencia de un gradiente ascendente de UPA hay una acumulación significativa de espermatozoides respecto del control negativo. La máxima acumulación se observó a una concentración 1 pM de UPA, y la respuesta fue similar a la acumulación inducida por el control positivo de progesterona. También, se puede observar que la respuesta de acumulación en función de la concentración de UPA tiene una forma de campana, lo cual sugiere que está inducida por un mecanismo de quimioatracción (Adler 1973).

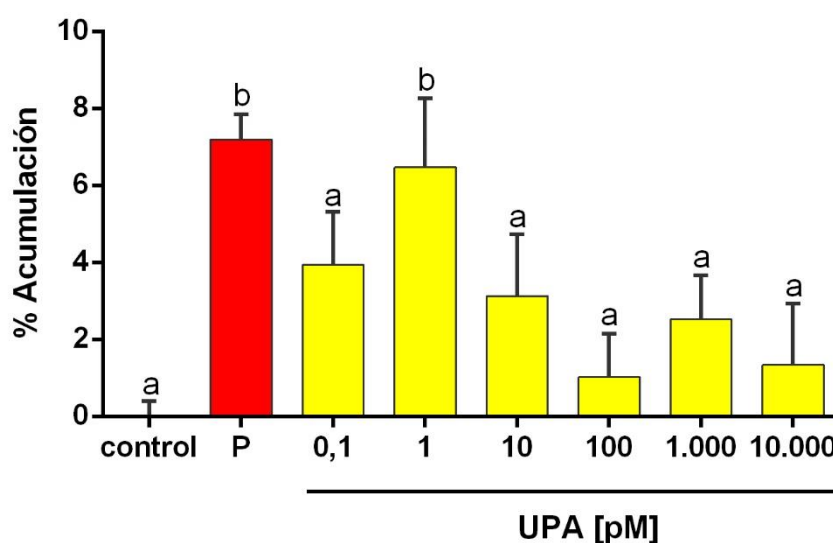


Figura 8. El acetato de ulipristal (UPA) induce quimioatracción en espermatozoides bovinos *in vitro*. Se evaluó el porcentaje de acumulación espermática inducida por un gradiente ascendente de UPA a distintas concentraciones (0,1 a 10.000 pM). Se empleó medio sp-TALP como control negativo (control) y progesterona 1 pM (P) como control positivo de quimioatracción. Los resultados están expresados como la media \pm E.E. de 3 a 7 experimentos independientes. Letras minúsculas iguales (a, b) indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos.

El acetato de ulipristal no modifica los parámetros cinéticos de los espermatozoides bovinos.

La acumulación de espermatozoides en el W2 del ESE puede deberse a un mecanismo de quimioatracción, pero también puede deberse a quimiocinesis (un incremento en la velocidad de los espermatozoides) o a un atrapamiento (inducido por un cambio en el patrón de movimiento) (Giojalas y col., 2015). Por ello, se pre-incubaron los espermatozoides por 10 minutos con distintas dosis de UPA y luego se les evaluó por video-microscopía y análisis de imagen la velocidad y el patrón de movimiento (lineal, transicional e hiperactivado). También se evaluó el efecto de la progesterona 1 pM y el medio de cultivo sp-TALP como control negativo.

Los resultados muestran que el UPA no induce cambios en la velocidad curvilínea (VCL; Fig. 9a), en la velocidad lineal (VSL; Fig. 9b) ni en la velocidad promedio (VAP; Fig. 9c). También se observa que no induce cambios en el patrón de movimiento respecto de la progesterona y del control negativo (Fig. 10).

En conjunto, estos resultados indican que la acumulación espermática inducida por el gradiente de UPA es debido a un mecanismo de quimioatracción.

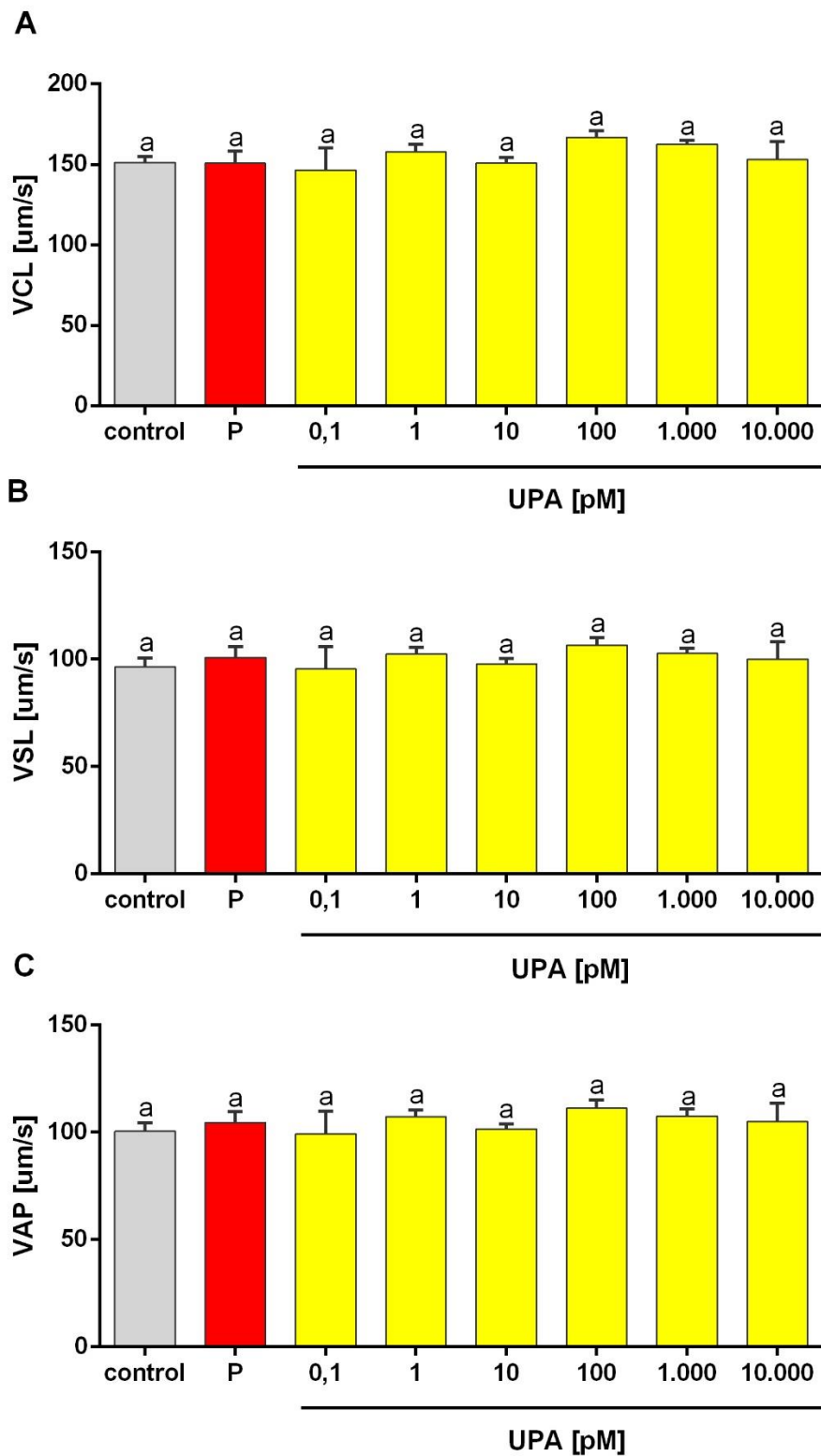


Figura 9. El acetato de ulipristal (UPA) no modifica la velocidad de los espermatozoides bovinos. La presencia de UPA o progesterona (P) no afecta la velocidad de movimiento de los espermatozoides respecto del control negativo. Los resultados están expresados como la media \pm E.E. de 3 experimentos independientes. Letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos.

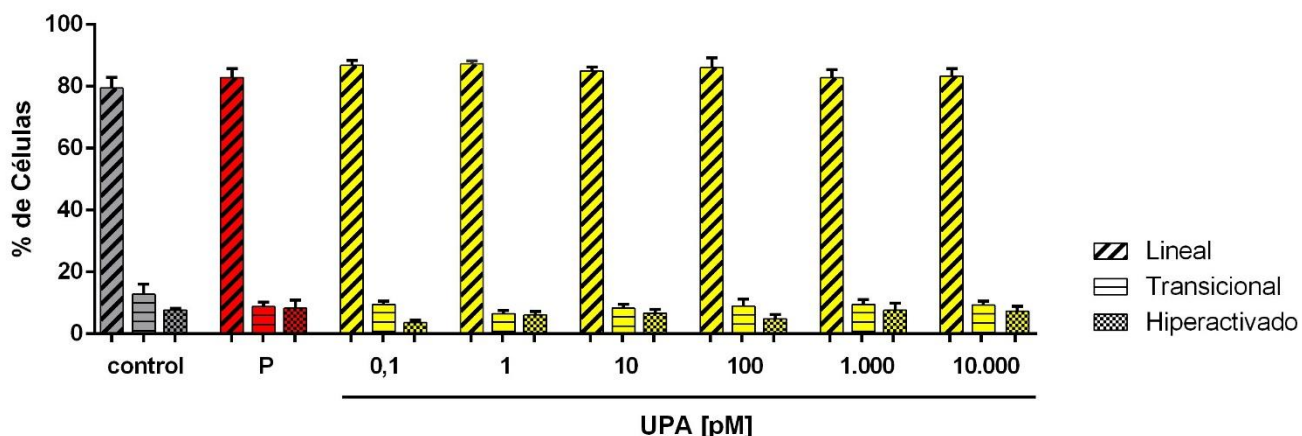


Figura 10. El acetato de ulipristal (UPA) no modifica el patrón de movimiento de los espermatozoides bovinos. La presencia de UPA o progesterona (P) no afecta el tipo de movimiento de los espermatozoides. Control, medio sp-TALP. Los resultados están expresados como la media \pm E.E. de 3 experimentos independientes. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para todos los tipos de movimiento (lineal, transicional e hiperactivado).

El acetato de ulipristal inhibe la quimioatracción inducida por la progesterona en espermatozoides bovinos.

Se ha reportado que la respuesta quimioattractante de los espermatozoides hacia la progesterona puede modificarse en presencia del UPA, convirtiendo a la progesterona en quimiorepelente en humanos, conejo y ratón (Guidobaldi y col., 2017). Por lo tanto, evaluamos el efecto del UPA sobre la orientación quimiotáctica de los espermatozoides de bovino hacia la progesterona. Para ello, los espermatozoides se pre-incubaron con distintas concentraciones de UPA por 10 min y luego se realizó el ESE colocando los espermatozoides con UPA en el W1. La progesterona 1 pM junto al UPA se colocó en el W2, en tanto que el tubo conector se cargó con UPA en medio de cultivo. De esta manera, el UPA quedó distribuido en forma homogénea en toda la cámara del ESE y los espermatozoides enfrentados a un gradiente ascendente de progesterona. Luego, se evaluó el porcentaje de acumulación de espermatozoides en el W2 respecto de un control negativo de medio de cultivo sp-TALP.

En la figura 11 se observa que la acumulación inducida por la progesterona es inhibida en presencia del UPA homogéneo hasta la concentración 1 pM y esta inhibición se revierte a una concentración de UPA 0,1 pM. La presencia de UPA distorsiona el gradiente de progesterona debido a un efecto aditivo en la concentración de “ambos atractantes” dando como resultado una concentración final mayor a la atractante e inhibiendo la respuesta

quimioattractante hacia la progesterona. En tanto que, por debajo del umbral de concentración de máxima respuesta del UPA (1 pM), el efecto aditivo no es significativo, por lo tanto, no distorsiona significativamente el gradiente y por ello, los espermatozoides pueden ser quimioatraídos hacia la progesterona.

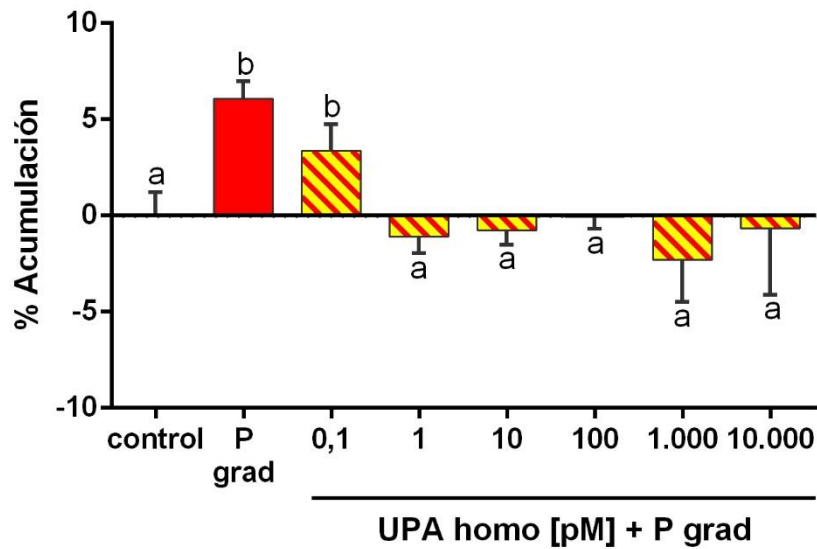


Figura 11. El UPA inhibe la orientación quimiotáctica hacia la progesterona en espermatozoides bovinos. Los espermatozoides capacitados, se pre-incubaron con diferentes concentraciones de UPA y luego se emplearon para realizar el ESE empleando progesterona 1 pM como quimioattractante. El UPA se agregó de manera tal de que quedara distribuirlo homogéneamente en la cámara del ESE. Los resultados están expresados como la media \pm E.E. de 4 experimentos independientes. Letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos.

En conjunto, estos resultados sugieren que en espermatozoides bovinos el UPA estaría actuando como un agonista de la progesterona debido a que, induce quimioatracción cuando está sólo en forma de gradiente, e inhibe la respuesta quimioattractante hacia la progesterona cuando están juntos.

El zinc induce quimioatracción en espermatozoides bovinos *in vitro*.

Al igual que el UPA, en humanos se ha observado que el zinc cuando está en forma de gradiente puede inducir quimiorepulsión en espermatozoides. Por lo tanto, se evaluó el efecto del zinc en la orientación de espermatozoides bovinos mediante el ESE. De esta manera, los espermatozoides capacitados se enfrentaron a un gradiente de concentración ascendente de zinc en un ensayo dosis dependiente. En paralelo, se realizó un control negativo empleando medio de cultivo sp-TALP y un control positivo de quimioatracción empleando progesterona 1 pM. Luego, se evaluó el porcentaje de acumulación de espermatozoides en el W2 respecto del control negativo.

En la figura 12 se observa que en presencia de un gradiente ascendente de zinc hay una acumulación significativa de espermatozoides en el W2 respecto del control negativo.

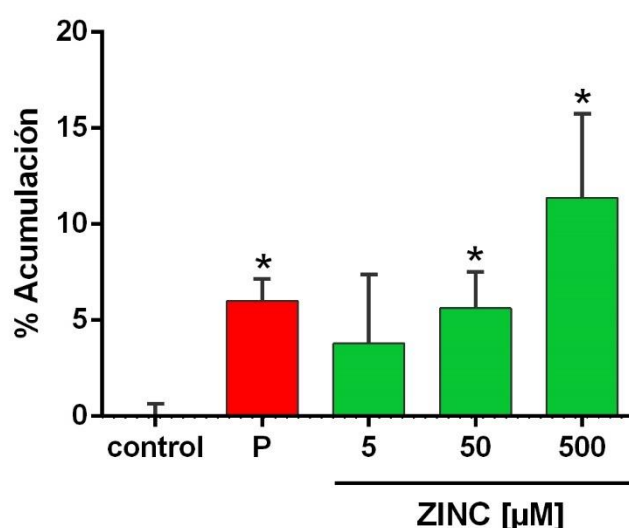


Figura 12. El zinc induce quimioatracción en los espermatozoides bovinos *in vitro*. Se evaluó el porcentaje de acumulación espermática inducida por un gradiente ascendente de zinc a distintas concentraciones (5 a 500 μ M). Se empleó medio sp-TALP como control negativo (control) y progesterona 1 pM (P) como control positivo de quimioatracción. Los resultados están expresados como la media \pm E.E. de 3 experimentos independientes. Se realizó un test “t” para diferencias respecto del control. Asteriscos (*) indican diferencias significativas.

El zinc no modifica los parámetros cinéticos de los espermatozoides bovinos.

Como mencionamos anteriormente, la acumulación de espermatozoides en el W2 del ESE puede deberse a quimioatracción, quimiotaxis o atrapamiento (Giojalas y col., 2015). En consecuencia, evaluamos si el zinc afecta la velocidad o el patrón de movimiento de los espermatozoides bovinos por video-microscopía y análisis de imágenes. En paralelo se evaluó el efecto de la progesterona 1 pM y el medio de cultivo sp-TALP como controles positivo y negativo respectivamente.

Los resultados muestran que el zinc no induce cambios en la velocidad curvilínea (VCL; Fig. 13a), excepto a la concentración 500 μ M. En tanto que la velocidad lineal (VSL; Fig. 13b) y la velocidad promedio (VAP; Fig. 13c) no se vieron afectadas por la presencia del zinc. También, se observó que el zinc no indujo cambios significativos en el patrón de movimiento respecto de los control positivo y negativo (Fig. 14).

En conjunto, estos resultados sugieren que la acumulación espermática obtenida en el W2 inducida por el gradiente de zinc es debido a un mecanismo de quimioatracción.

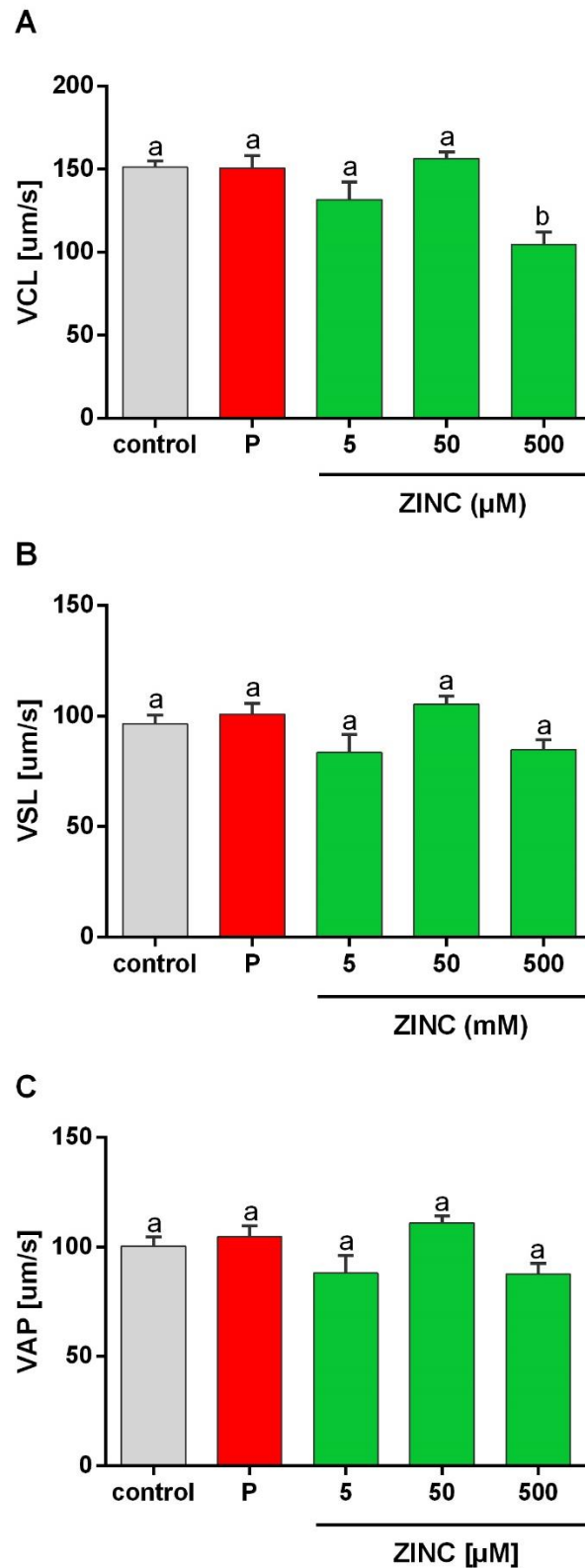


Figura 13. El zinc no modifica la velocidad de los espermatozoides bovinos. La presencia de zinc o progesterona (P) no afecta la velocidad de movimiento de los espermatozoides respecto del control negativo. Los resultados están expresados como la media \pm E.E. de 3 experimentos independientes para cada tratamiento. Letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos.

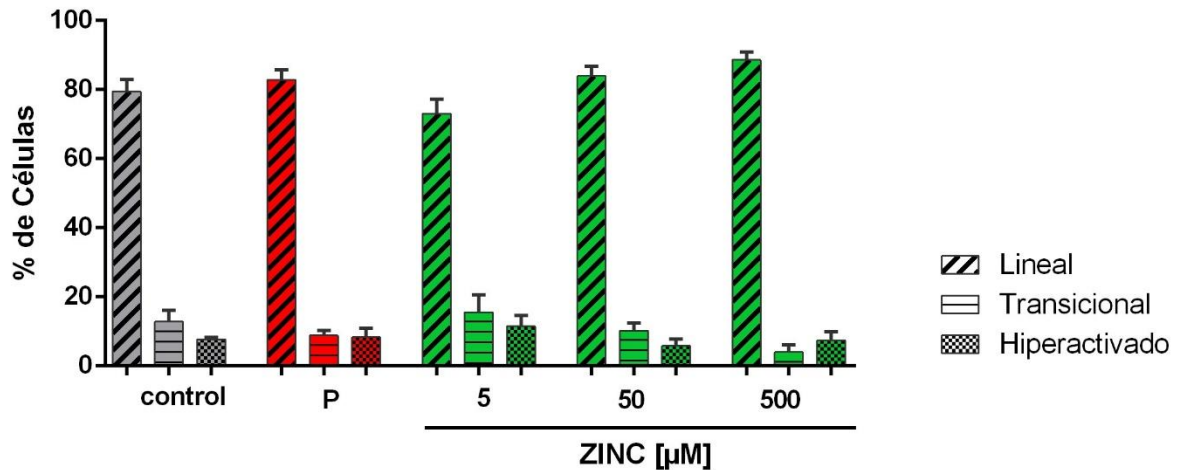


Figura 14. El zinc no modifica el patrón de movimiento de los espermatozoides bovinos. La presencia de zinc o progesterona (P) no afecta el tipo de movimiento de los espermatozoides. Control, medio sp-TALP. Los resultados están expresados como la media \pm E.E. de 3 experimentos independientes. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para todos los tipos de movimiento (lineal, transicional e hiperactivado).

El zinc no afecta la quimioatracción inducida por la progesterona en espermatozoides bovinos.

En humanos, se ha reportado que el zinc puede convertir la respuesta quimioattractante de progesterona en quimiorepelente en condiciones *in vitro* (Guidobaldi y col., 2017). Por lo tanto, se evaluó el efecto del zinc sobre la quimioatracción espermática mediada por la progesterona en bovinos. Para ello, los espermatozoides se pre-incubaron con distintas concentraciones de zinc por 10 min y luego se realizó el ESE colocando los espermatozoides con zinc en el W1. La progesterona 1pM junto con el zinc se colocó en el W2, en tanto que el tubo conector se cargó con zinc en medio de cultivo. De esta manera, el zinc quedó distribuido en forma homogénea en toda la cámara del ESE y los espermatozoides enfrentados a un gradiente ascendente de progesterona. En paralelo, se realizó un control negativo empleando medio de cultivo sp-TALP y un control positivo de quimioatracción hacia progesterona 1 pM. Luego, se evaluó el porcentaje de acumulación de espermatozoides en el W2.

En la figura 15 se observa que, en presencia de zinc homogéneo y de un gradiente ascendente de progesterona, hay una acumulación significativa de espermatozoides en el W2 respecto del control negativo y que no se diferencia del control positivo de progesterona, aunque se observa un incremento en la magnitud de la respuesta.

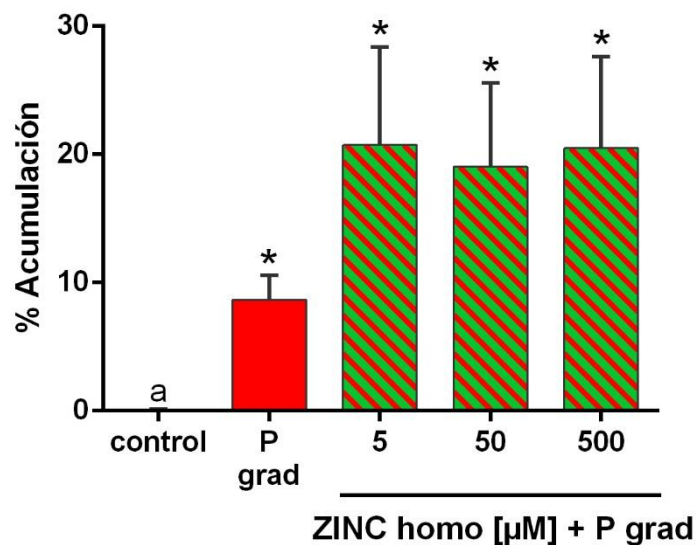


Figura 15. El zinc no afecta la quimioatracción inducida por la progesterona en espermatozoides bovinos. Los espermatozoides capacitados, se pre-incubaron con diferentes concentraciones de zinc y luego se emplearon para realizar el ESE empleando progesterona 1 pM como quimioattractante. El zinc se agregó de manera tal de que quedara distribuirlo homogéneamente en la cámara del ESE. Los resultados están expresados como la media \pm E.E. de 5 experimentos independientes. Se realizó un test “t” para diferencias respecto del control. Asteriscos (*) indican diferencias significativas.

En conjunto, estos resultados sugieren que el zinc puede inducir quimioatracción en espermatozoides bovinos. Y su presencia, no altera la forma en que los espermatozoides se orientan hacia la progesterona.

Discusión

En el presente trabajo se observó que el UPA induce quimioatracción en espermatozoides bovinos cuando está formando un gradiente y la presencia de esta sustancia inhibe el efecto quimioatractante de la progesterona. Debido a que se ha reportado que el UPA induce quimiorepulsión en otras especies, verificamos el efecto del UPA en espermatozoides humanos y corroboramos que en estos induce quimiorepulsión y que convierte el gradiente atrayente de progesterona en repelente. Confirmando de esta manera que los resultados observados en bovinos son propios de esta especie. También se observó que un gradiente de zinc induce quimioatracción en bovinos. Sin embargo, la presencia de este catión no inhibe la quimioatracción mediada por la progesterona e incluso podría estimularla.

La fecundación en mamíferos es el resultado del encuentro y fusión de un ovocito con un solo espermatozoide. Esta relación óptima de gametas (1:1), es el resultado de un delicado balance entre la necesidad de garantizar la llegada de un espermatozoide fisiológicamente apto y a la vez, evitar que el “resto” logre llegar al ovocito. En este sentido, los mecanismos de orientación espermática cumplirían una función activa regulando el proceso de fecundación. Así como la quimioatracción permitiría seleccionar y guiar a los espermatozoides que están aptos para fecundar (Giojalas y col., 2015), la quimiorepulsión podría evitar la poliespermia actuando de manera inmediata luego de la fecundación (Guidobaldi y col., 2017). En mamíferos, las células del cumulus secretan activamente progesterona (Guidobaldi y col., 2008; Oren-Benaroya y col., 2008; Teves y col., 2006) que puede formar un gradiente de concentración más allá del cumulus atrayendo a los espermatozoides capacitados (Giojalas y col., 2015).

Recientemente, se ha demostrado en varias especies, que el gradiente de progesterona se puede convertir en quimiorepelente en presencia de sustancias análogas a la progesterona como el UPA o en presencia de zinc (Guidobaldi y col., 2017), que es un catión liberado por el ovocito fecundado (Kim y col., 2011; Que y col., 2017). Sin embargo, este mecanismo de repulsión no se observó en espermatozoides de bovino evaluados en esta tesina.

En bovinos, se observó que el UPA indujo una acumulación significativa de espermatozoides en el ESE de manera dosis dependiente y en forma de campana (Adler, 1973), sin afectar los parámetros cinéticos lo cual es compatible con un mecanismo de quimioatracción. (Giojalas y col., 2015). Además, se observó que la presencia de esta sustancia inhibe la respuesta quimioatractante hacia la progesterona. La respuesta quimiotáctica depende

de la distribución en forma de gradiente del attractante (Adler, 1973) y de la concentración específica del mismo (Uñates y col., 2014). Dado que, en bovinos el UPA estaría actuando como agonista de la progesterona, al colocar ambos compuestos juntos la concentración final del “attractante” es igual a la suma de concentraciones (Uñates y col., 2014) y la respuesta quimiotáctica es acorde a la concentración final. Cuando la concentración de UPA fue igual o mayor a la concentración quimioattractante (1pM), la respuesta hacia la progesterona fue inhibida. Sin embargo, a concentraciones de UPA menores a la concentración attractante, la respuesta quimioattractante hacia la progesterona no se vio afectada, debido a que la concentración del gradiente resultante de ambos compuestos es similar a cuando está sólo la progesterona.

En cuanto al efecto del zinc en la orientación quimiotáctica de espermatozoides de bovino, se observó que un gradiente de zinc puede inducir una acumulación significativa de espermatozoides en el ESE. Dado que no se vieron afectados los parámetros cinéticos, esta respuesta es compatible con un mecanismo de quimioatracción (Giojalas y col., 2015). Por otro lado, la presencia de zinc no inhibió la respuesta quimiotáctica inducida por un gradiente de progesterona y, por el contrario, se observó una tendencia a incrementar la respuesta quimioattractante inducida por esta. A diferencia de lo observado en humanos (Guidobaldi y col., 2017), los resultados sugieren que en bovinos el zinc puede inducir quimioatracción per se y que su presencia podría potenciar la respuesta quimioattractante de la progesterona.

Los resultados del efecto del UPA y el zinc obtenidos en esta tesina plantean nuevos interrogantes sobre la participación de estas sustancias en la regulación de la quimiorepulsión. Si bien resulta evidente que todos los espermatozoides de mamíferos tienen el mismo objetivo de encontrar y fecundar al ovocito, los mecanismos moleculares que utilizan para este fin pueden diferir entre las especies (Lishko y col., 2016). Y, de la misma manera, es posible inferir que también podrían variar los mecanismos que utilizan para evitar que ocurra la poliespermia. La liberación de zinc por ovocitos fecundados sólo ha sido reportada hasta el momento en ratón (Kim y col., 2011), por lo que en bovinos podrían existir otra/s sustancia/s quimiorepelente/s liberadas por el ovocito luego de la fecundación y no identificadas hasta el momento. Así como también es posible que en bovinos la regulación de la poliespermia no dependa de la quimiorepulsión.

Por otro lado, en el trabajo donde se caracterizó previamente la quimiorepulsión en varias especies de mamíferos (Guidobaldi y col., 2017), los experimentos se realizaron con muestras de semen fresco. Sin embargo, en esta tesina se utilizaron muestras de semen bovino

criopreservadas. La criopreservación resulta una técnica útil para conservar material genético con potencial fértil disponible en cualquier época del año (Watson, 1995). Pero también, es un procedimiento que afecta la estructura y la fisiología celular y en algunos casos, de manera irreversible. Se sabe que, durante la congelación y descongelación de las muestras, se producen alteraciones celulares que causan la muerte de gran parte de las células debido al daño ocasionado durante el procesamiento y también, alteraciones a nivel de la membrana plasmática en las células que permaneces vivas (Parks & Graham, 1992; Watson, 2000). Durante la congelación/descongelación, se altera la composición lipídica y la fluidez de la membrana plasmática (Watson, 2000). Además, se ha reportado que los espermatozoides congelados/descongelados tienen problemas para llevar a cabo uniones del tipo receptor-ligando y se ven afectados a menudo los mecanismos de señalización intracelular (Watson, 2000). Por ejemplo, se ve afectada la capacidad del espermatozoide para interactuar con el epitelio oviductal (Ellington y col., 1999) y para interactuar con las vestiduras del ovocito (Oehninger y col., 1993). Estas alteraciones en la membrana plasmática quizás podrían estar afectando la señalización intracelular de la respuesta quimiorrepelente, inducida por el zinc y/o el UPA.

Si bien aún no se ha identificado el receptor de progesterona involucrado en la quimiotaxis, hay indicios de que la quimioatracción y la quimiorrepulsión compartirían la misma vía de señalización (Molino y col., 2015), lo cual sugiere que ambos mecanismos de orientación podrían estar regulados por el mismo receptor de membrana. Resultados preliminares de nuestro laboratorio, sugieren que el receptor de progesterona, mPR α , que está presente en la membrana plasmática de varias especies animales, incluidos los mamíferos (Thomas, 2008), estaría regulando la quimioatracción hacia la progesterona (Guidobaldi, comentario personal). Este receptor, además del sitio de unión de progesterona, posee un sitio de unión para zinc, no obstante, aún debe determinarse cómo participa este catión en la regulación del receptor y su relación con la quimiotaxis. Cabe la posibilidad de que las alteraciones de membrana inducidas por la criopreservación afecten al receptor y por ende a la orientación espermática. No obstante, todavía queda por corroborar la participación de este receptor en la quimiotaxis de espermatozoides bovinos congelados/descongelados. También, sería pertinente evaluar en otras especies de mamíferos donde se ha observado quimiorrepulsión, si la criopreservación puede alterar la respuesta quimiorrepelente hacia el UPA y/o hacia el zinc.

En síntesis, en este trabajo se evaluó el efecto de dos compuestos previamente caracterizados como quimiorrepelentes. La combinación de resultados obtenidos, demostraron

que el UPA y el zinc inducen quimioatracción en espermatozoides congelados/descongelados de bovino. Estos resultados, plantean nuevos interrogantes sobre la regulación de la quimiotaxis espermática en mamíferos.

Bibliografía

- Adler, J. (1973). A Method for Measuring Chemotaxis and Use of the Method to Determine Optimum Conditions for Chemotaxis by *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 74(1), 77–91. <https://doi.org/10.1099/00221287-74-1-77>
- Andrews, J. C., Nolan, J. P., Hammerstedt, R. H., & Bavister, B. D. (1994). Role of Zinc during Hamster Sperm Capacitation'. *Biology of Reproduction*, 51(April), 1238–1247. <https://doi.org/10.1095/biolreprod51.6.1238>
- Bahat, A. et al. (2003). Thermotaxis of mammalian sperm cells : A potential Is alloantigen expression by host epithelium required for acute graft-versus-host disease ? *Nature Medicine*, 9(2), 149–150. <https://doi.org/10.1038/nm0203-149>
- Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D., & Wright, G. J. (2014). Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature*, 508(7497), 483–487. <https://doi.org/10.1038/nature13203>
- Björndahl, L., Kjellberg, S., Roomans, G. M., & Kvist, U. (1986). The human sperm nucleus takes up zinc at ejaculation. *International Journal of Andrology*, 9(1), 77–80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1986.tb00869.x>
- Bouchard, P., Chabbert-Buffet, N., & Fauser, B. C. J. M. (2011). Selective progesterone receptor modulators in reproductive medicine: Pharmacology, clinical efficacy and safety. *Fertility and Sterility*, 96(5), 1175–1189. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.08.021>
- Brache, V., Cochon, L., Deniaud, M., & Croxatto, H. B. (2013). Ulipristal acetate prevents ovulation more effectively than levonorgestrel: Analysis of pooled data from three randomized trials of emergency contraception regimens. *Contraception*, 88(5), 611–618. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2013.05.010>
- Brache, V., Cochon, L., Jesam, C., Maldonado, R., Salvatierra, A. M., Levy, D. P., ... Croxatto, H. B. (2010). Immediate pre-ovulatory administration of 30 mg ulipristal acetate significantly delays follicular rupture. *Human Reproduction*, 25(9), 2256–2263. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq157>
- Chabbert-Buffet, N., Meduri, G., Bouchard, P., & Spitz, I. M. (2005). Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: Mechanisms of action and clinical applications. *Human Reproduction Update*, 11(3), 293–307. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi002>
- Chenouard, N., Smal, I., De Chaumont, F., Maška, M., Sbalzarini, I. F., Gong, Y., ... Meijering, E. (2014). Objective comparison of particle tracking methods. *Nature Methods*, 11(3), 281–289. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2808>
- Chimienti, F., Seve, M., Richard, S., Mathieu, J., & Favier, A. (2001). Role of cellular zinc in programmed cell death: temporal relationship between zinc depletion, activation of caspases, and cleavage of Sp family transcription factors. *Biochemical Pharmacology*, 62(1), 51–62. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00624-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00624-4)
- De Jonge, C. (2005). Biological basis for human capacitation. *Human Reproduction Update*, 11(3), 205–214. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi010>
- Dominguez, E., Moreno, A., Guidobaldi, H., Tribulo, H., & Giojalas, L. (2018). Improved bovine in vitro embryo production with sexed and unsexed sperm selected by chemotaxis. *Theriogenology*.
- Eisenbach, M. (editor). (2004). *Chemotaxis*. Retrieved from <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>
- Ellington, J. E., Samper, J. C., Jones, A. E., Oliver, S. A., Burnett, K. M., & Wright, R. W. (1999). In vitro interactions of cryopreserved stallion spermatozoa and oviduct (uterine

- tube) epithelial cells or their secretory products. *Animal Reproduction Science*, 56(1), 51–65. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(99\)00030-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(99)00030-5)
- Foresta, C., Garolla, A., Cosci, I., Menegazzo, M., Ferigo, M., Gandin, V., & De Toni, L. (2014). Role of zinc trafficking in male fertility: From germ to sperm. *Human Reproduction*, 29(6), 1134–1145. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu075>
- Gardner, A. J., & Evans, J. P. (2006). Mammalian membrane block to polyspermy: New insights into how mammalian eggs prevent fertilisation by multiple sperm. *Reproduction, Fertility and Development*, 18(1–2), 53–61. <https://doi.org/10.1071/RD05122>
- Gatica, L. V., Guidobaldi, H. A., Montesinos, M. M., Teves, M. E., Moreno, A. I., Uñates, D. R., ... Giojalas, L. C. (2013). Picomolar gradients of progesterone select functional human sperm even in subfertile samples. *Molecular Human Reproduction*, 19(9), 559–569. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat037>
- Giojalas, L. C., Guidobaldi, H. A., & Sánchez, R. (2015). Sperm Chemotaxis in Mammals. *Flagellar Mechanics and Sperm Guidance*, 272–307. <https://doi.org/10.2174/9781681081281115010012>
- Glasier, A. F., Cameron, S. T., Fine, P. M., Logan, S. J., Casale, W., Van Horn, J., ... Gainer, E. (2010). Ulipristal acetate versus levonorgestrel for emergency contraception: a randomised non-inferiority trial and meta-analysis. *The Lancet*, 375(9714), 555–562. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60101-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60101-8)
- Guidobaldi, H. A., Teves, M. E., Uñates, D. R., Giojalas, L. C. (2012). Sperm transport and retention at the fertilization site is orchestrated by a chemical guidance and oviduct movement. *Reproduction*, 143(5), 587–596. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0478>
- Guidobaldi, H. A., Cubilla, M., Moreno, A., Molino, M. V., Bahamondes, L., & Giojalas, L. C. (2017). Sperm chemorepulsion, a supplementary mechanism to regulate fertilization. *Human Reproduction*, 32(8), 1560–1573. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex232>
- Guidobaldi, H. A., Hirohashi, N., Cubilla, M., Buffone, M. G., & Giojalas, L. C. (2017). An intact acrosome is required for the chemotactic response to progesterone in mouse spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 84(4), 310–315. <https://doi.org/10.1002/mrd.22782>
- Guidobaldi, H. A., Teves, M. E., Uñates, D. R., Anastasia, A., & Giojalas, L. C. (2008). Progesterone from the cumulus cells is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus complex. *PloS One*, 3(8), e3040. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003040>
- Ito M, Smith T, Y. R. (1991). Effect of ovulation on sperm transport in the hamster oviduct. *Journal of Reproduction and Fertility*, 93(1), 157–163. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0930157>
- Kaki, M. (2001). El zinc en endocrinología. *International Pediatrics*, 16(3), 1–10.
- Kerns, K., Zigo, M., Drobnis, E. Z., Sutovsky, M., & Sutovsky, P. (2018). Zinc ion flux during mammalian sperm capacitation. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04523-y>
- Kim, A. M., Bernhardt, M. L., Kong, B. Y., Ahn, R. W., Vogt, S., Woodruff, T. K., & O'Halloran, T. V. (2011). Zinc sparks are triggered by fertilization and facilitate cell cycle resumption in mammalian eggs. *ACS Chemical Biology*, 6(7), 716–723. <https://doi.org/10.1021/cb200084y>
- Kim, A. M., Vogt, S., O'Halloran, T. V., & Woodruff, T. K. (2010). Zinc availability regulates exit from meiosis in maturing mammalian oocytes. *Nature Chemical Biology*, 6(9), 674–681. <https://doi.org/10.1038/nchembio.419>
- Ko, J. K. Y., Huang, V. W., Li, R. H. W., Yeung, W. S. B., Ho, P. C., & Chiu, P. C. N. (2014). An in vitro study of the effect of mifepristone and ulipristal acetate on human sperm functions. *Andrology*, 2(6), 868–874. [33](https://doi.org/10.1111/j.2047-</p>
</div>
<div data-bbox=)

2927.2014.00261.x

- Kochańczyk, T., Drozd, A., & Krężel, A. (2015). Relationship between the architecture of zinc coordination and zinc binding affinity in proteins – insights into zinc regulation. *Metallomics*, 7(2), 244–257. <https://doi.org/10.1039/C4MT00094C>
- Kruczynski, D., Passia, D., Haider, S. G., & Glassmeyer, M. (1985). Zinc Transport through Residual Bodies in the Rat Testis; a Histochemical Study, 17(1), 1984–1986.
- Lishko, P. V., Miller, M. R., & Mansell, S. A. (2016). The Role of Sperm Ion Channels in Reproduction. In *Ion Channels in Health and Disease* (pp. 223–238). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802002-9.00009-1>
- Maret, W. (2013). Zinc Biochemistry: From a Single Zinc Enzyme to a Key Element of Life. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 4(1), 82–91. <https://doi.org/10.3945/an.112.003038>
- Miki, K., & Clapham, D. E. (2013). Rheotaxis guides mammalian sperm. *Current Biology*, 23(6), 443–452. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.02.007>
- Molino MV, Cubilla M, Guidobaldi HA, Moreno A, Bahamondes L, G. L. (2015). El levonorgestrel induce quimiorepulsión en espermatozoides de mamíferos. In *3ra Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina*. San Miguel de Tucumán, Tucumán.
- Mortimer, S. T., & Swan, M. A. (1995). Kinematics of capacitating human spermatozoa analysed at 60 Hz, 10(4), 873–879.
- Munuce, M. J., Zumoffen, C., Cicaré, J., Caille, A., Ghersevich, S., & Bahamondes, L. (2012). Effect of exposure to ulipristal acetate on sperm function. *The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care*, 17(6), 428–437. <https://doi.org/10.3109/13625187.2012.725877>
- Nallasamy, S., Kim, J., Sitruk-Ware, R., Bagchi, M., & Bagchi, I. (2013). Ulipristal blocks ovulation by inhibiting progesterone receptor-dependent pathways intrinsic to the ovary. *Reproductive Sciences*, 20(4), 371–381. <https://doi.org/10.1177/1933719112459239>
- Oehninger, S., Morshedi, M., Ertunc, H., Philput, C., Bocca, S. M., Acosta, A. A., & Hodgen, G. D. (1993). Validation of the hemizona assay (HZA) in a monkey model. II. Kinetics of binding and influence of cryopreserved-thawed spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 10(4), 292–301. <https://doi.org/10.1007/BF01204945>
- Oren-Benaroya, R., Orvieto, R., Gakamsky, a, Pinchasov, M., & Eisenbach, M. (2008). The sperm chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 23(10), 2339–2345. <https://doi.org/10.1093/humrep/den265>
- Parks, J. E., & Graham, J. K. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38(2), 209–222. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90231-F](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90231-F)
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Eyestone, W. H., & First, N. L. (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25(4), 591–600. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(86\)90143-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(86)90143-3)
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J., Winer, M. A., & First, N. L. (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction*, 38(5), 1171–1180.
- Que, E. L., Duncan, F. E., Bayer, A. R., Philips, S. J., Roth, E. W., Bleher, R., ... Halloran, T. V. O. (2017). Zinc sparks induce physiochemical changes in the egg zona pellucida that prevent polyspermy. *Integrative Biology*, 9, 135–144. <https://doi.org/10.1039/C6IB00212A>
- Rosato, E., Farris, M., & Bastianelli, C. (2016). Mechanism of action of ulipristal acetate for emergency contraception: A systematic review. *Frontiers in Pharmacology*, 6(JAN). <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00315>

- Saavedra, M. D., Mondéjar, I., Coy, P., Betancourt, M., González-Márquez, H., Jiménez-Movilla, M., ... Romar, R. (2014). Calreticulin from subolemmal vesicles affects membrane regulation of polyspermy. *Reproduction*, *147*(3), 369–378. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0454>
- Sbalzarini, I. F., & Koumoutsakos, P. (2005). Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology. *Journal of Structural Biology*, *151*(2), 182–195. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.06.002>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Snook, R. R., Hosken, D. J., & Karr, T. L. (2011). The biology and evolution of polyspermy: insights from cellular and functional studies of sperm and centrosomal behavior in the fertilized egg. *Reproduction*, *142*(6), 779–792. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0255>
- Suarez, S. S. (2002). Formation of a Reservoir of Sperm in the Oviduct. *Reproduction in Domestic Animals*, *37*, 140–143.
- Teves, M. E., Barbano, F., Guidobaldi, H. A., Sanchez, R., Miska, W., & Giojalas, L. C. (2006). Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertility and Sterility*, *86*(3), 745–749. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.02.080>
- Thomas, P. (2008). Characteristics of membrane progesterin receptor alpha (mPR α) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progesterin actions. *Frontiers in Neuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2008.01.001>
- Uñates, D. R., Guidobaldi, A., Gatica, L. virginia, Cubilla, M. A., Giojalas, L. C., & Teves, E. (2014). Versatile Action of Picomolar Gradients of Progesterone on Different Sperm Subpopulations. *PLoS ONE*, *9*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091181>
- Vallee, B. L., & Falchuk, K. H. (1993). *The biochemical basis of zinc physiology. Physiological reviews* (Vol. 73). <https://doi.org/10.1152/physrev.1993.73.1.79>
- Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, *7*(4), 871–891. <https://doi.org/10.1071/RD9950871>
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, *60–61*, 481–492. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3)
- Wilcox, A. J., Weinberg, C. R., & Baird, D. D. (1996). Timing of Sexual Intercourse in Relation to Ovulation. *Obstetrical & Gynecological Survey*, *51*(6), 357–358. <https://doi.org/10.1097/00006254-199606000-00016>
- Wong, J. L., & Wessel, G. M. (2005). Defending the Zygote: Search for the Ancestral Animal Block to Polyspermy. *Current Topics in Developmental Biology*, *72*(05), 1–151. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(05\)72001-9](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(05)72001-9)
- Yániz, J. L., Lopez-Gatius, F., Santolaria, P. & Mullins, K. J. (2000). Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *THE ANATOMICAL RECORD*, *260*(August 1999), 268–278.

Agradecimientos

Al Dr. Alejandro Guidobaldi, mi director, por permitirme formar parte de su proyecto de investigación, por su constante guía en la elaboración del presente trabajo, su paciencia, buena predisposición y confianza.

A mis compañeros de laboratorio, becarios e investigadores que forman parte del CEBICEM que siempre que tuve una duda supieron ayudarme. Por su generosidad en cuanto a los materiales y el espacio que me brindaron para llevar a cabo estos experimentos y por los momentos compartidos. Al Biólogo Iván Barberá por ayudarme con el análisis estadístico.

A todos los docentes de la Escuela de Biología, que me formaron en esta hermosa profesión.

A los integrantes de mi Tribunal de Tesina, Dra. Laura Giojalas, Dra. Anahí Franchi, y Dr. Gustavo Baiardi que de manera altruista formaron parte de este proceso y me obsequiaron parte de sus horas.

A mis compañeros de la facultad, con los que pude formar un gran y hermoso grupo que hizo del transcurso de esta carrera la mejor experiencia que podría imaginarme.

A mis amigas de toda la vida, que me acompañaron y apoyaron en todo momento, y me supieron sacar una sonrisa cuando más lo necesitaba.

Para finalizar, agradezco enormemente a mi familia, que es mi pilar y desde siempre me incentiva a lograr mis metas y me apoya incondicionalmente.