

REGULACIÓN DE LA MOTILIDAD DE ESPERMÁTOZOIDES OVINOS POR CALCIO

C. Colás, J.A. Cebrián-Pérez y T. Muiño-Blanco.

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Veterinaria.

Universidad de Zaragoza. E-mail: muino@unizar.es

INTRODUCCIÓN

El espermatozoide de mamíferos recién eyaculado no puede fecundar al ovocito. Para que adquiera capacidad fecundante ha de sufrir una serie de procesos de tipo bioquímico (capacitación) así como cambios en el patrón del movimiento del flagelo (hiperactivación) que le permiten al espermatozoide alcanzar la capacidad de sufrir la reacción acrosómica, mediante la cual liberará el contenido del acrosoma para poder fusionarse con el ovocito (Benoff 1993; De Jonge 1999; Yeagle 1991). En estudios previos hemos comprobado que calcio y bicarbonato son necesarios para la capacitación in vitro del espermatozoide de morueco, mientras que la albúmina sérica bovina no parece esencial (Grasa *et al.* 2006). Asimismo, hemos demostrado que el incremento artificial de cAMP produce un aumento significativo de la proporción de espermatozoides capacitados (Colas, James *et al.* 2008). Sin embargo, en estas condiciones no se logra la hiperactivación flagelar. Dado que la cafeína, a alta concentración, es inductora de la hiperactivación flagelar en espermatozoides bovinos (Marquez y Suarez 2007), estudiamos el efecto de dicho compuesto en espermatozoides ovinos. En esta comunicación describimos un nuevo protocolo con el cual, mediante alta concentración de cafeína, se inducen simultáneamente capacitación e hiperactivación, determinadas valorando motilidad (mediante un Sistema Computerizado de Análisis Seminal), integridad de membrana (doble tinción con CFDA/PI), y estado de capacitación (tinción con clorotetraciclina, CTC).

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la obtención del semen, mediante vagina artificial, se emplearon moruecos adultos entre 2 y 4 años, pertenecientes a la Asociación Nacional de Criadores de Ganado selecto de la raza Rasa Aragonesa pertenecientes a ANGRA, estabulados en la Facultad de Veterinaria bajo condiciones nutricionales uniformes. Con el objetivo de eliminar las diferencias individuales, para cada ensayo, se utilizó una mezcla de los segundos eyaculados de cuatro moruecos. Los experimentos se realizaron manteniendo los animales con un periodo de abstinencia de dos días, de acuerdo con estudios previos (Ollero *et al.* 1996).

La metodología utilizada para la obtención de espermatozoides libres de plasma seminal por un método de swim-up/dextrano, la evaluación de la viabilidad, y su valoración mediante la tinción con CTC, fue la descrita previamente (Perez-Pe *et al.* 2002). Los espermatozoides obtenidos mediante swim-up se diluyeron en medio TALP y se incubaron en condiciones capacitantes, tal y como se describe en (Colas *et al.* 2008). La muestra control de la capacitación contenía calcio 3 mM, bicarbonato 25 mM, y BSA 5 mg/ml, y para inducir la hiperactivación flagelar se añadió cafeína 10 mM.

La motilidad espermática se valoró en el transcurso de la incubación y utilizó un Sistema Computerizado de Análisis Seminal (PROISER): en un portaobjetos previamente atemperado se colocó una gota de 6 μ l de la dilución seminal, se cubrió con un cubreobjetos también atemperado. La visualización se realizó con un microscopio de contraste de fase con platina térmica atemperada a 37°C, conectado a una cámara de video, a su vez conectada a un ordenador con el programa de análisis seminal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Fig. 1 refleja el estado de capacitación de espermatozoides seleccionados por un proceso de swim-up/dextrano en condiciones control, así como en presencia de cafeína 10 mM.

Puede observarse que tras 3 horas de incubación en medio TALP (condiciones control), una proporción pequeña aunque significativamente estadística sufrió capacitación y reacción acrosómica ($P < 0.001$ para los tres estados fisiológicos). La proporción de

espermatozoides capacitados y reaccionados aumentó considerablemente con respecto a la condición control ($P < 0.001$ para los tres estados fisiológicos) en presencia de cafeína 10 mM. El cambio en el patrón de CTC estuvo acompañado por una pérdida significativa de viabilidad ($P < 0.001$).

El análisis de la motilidad espermática mediante sistemas computerizados permite una evaluación objetiva de una serie de parámetros relacionados con la misma, algunos de los cuales nos permiten caracterizar el tipo de movimiento que muestra la célula espermática. La motilidad activada es típica de espermatozoides eyaculados frescos, y se caracteriza por ondas simétricas de baja amplitud. Cuyo el espermatozoide llega al lugar de fertilización, su flagelo se mueve con ondas mucho más profundas y asimétricas, provocando así un movimiento en círculos o en forma de ocho (Yanagimachi 1969; Yanagimachi 1994; Ho y Suarez 2001; Ishijima *et al.* 2002). Evidencias actuales sugieren que el papel de la motilidad activada es la de propulsar al espermatozoide a través del tracto reproductor femenino hacia el oviducto, mientras que la motilidad hiperactivada tendría otras funciones: permitir que el espermatozoide atravesara la capa viscoelástica del moco cervical (Yanagimachi 1994), así como la penetración mecánica del *cumulus oophorus* y la zona pelúcida que rodean al ovocito (Ho y Suarez 2001; Suarez y Dai 1992). Además, en aquellas especies en las que el istmo del oviducto constituye un reservorio de espermatozoides, la hiperactivación es importante para la "liberación" del esperma de los pliegues y criptas del epitelio oviductal (Demott and Suarez 1992).

Para la evaluación de la hiperactivación, se utilizan habitualmente dos parámetros: ALH, que mide el desplazamiento lateral de la cabeza, y LIN, que expresa linealidad y se expresa en porcentaje ya que indica la relación porcentual entre la velocidad rectilínea y la curvilínea. Las células con un patrón de hiperactivación presentan trayectorias muy curvilíneas (y por tanto, valores bajos de LIN) y movimientos de cabeza de gran amplitud (valores elevados de ALH) como consecuencia del movimiento tan frenético del flagelo. La evolución de ambos parámetros en el transcurso de la incubación en condiciones control y en presencia de cafeína 10 mM se muestra en la figura 2, y de ella se deduce que la cafeína provoca hiperactivación, siendo significativo el efecto desde el inicio de la incubación.

En conclusión, describimos un nuevo protocolo con el que es posible inducir simultáneamente capacitación (evaluada por la tinción de CTC) e hiperactivación de espermatozoides ovinos. En estas condiciones, la hiperactivación se observa desde el inicio de la incubación, siendo máxima en el minuto ocho, momento a partir del cual la hiperactivación comienza a suavizarse. Mientras que la linealidad se mantiene en todo momento por debajo del control, el parámetro ALH alcanza los valores control a las dos horas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Benoff S (1993) Preliminaries to fertilization. *Hum Reprod* 8, 2001-6.
- Colas C, James P, Howes L, Jones R, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T 2008 *Reprod Fertil Dev* 20, 649-58.
- De Jonge C 1999 *J Androl* 20, 463-73.
- Demott RP, Suarez SS 1992 *Biol Reprod* 46, 779-85.
- Grasa P, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T 2006 *Reproduction* 132, 721-32.
- Ho HC, Suarez SS 2001 *Reproduction* 122, 519-26.
- Ishijima S, Baba SA, Mohri H, Suarez SS 2002 *Mol Reprod Dev* 61, 376-84.
- Marquez B, Suarez SS 2007 *Biol Reprod* 76, 660-5.
- Ollero M, Muino-Blanco T, Lopez-Perez MJ, Cebrian-Perez JA 1996. *Int J Androl* 19, 287-92.
- Perez-Pe R, Grasa P, Fernandez-Juan M, Peleato ML, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T 2002. *Mol Reprod Dev* 61, 226-33.
- Suarez SS, Dai X 1992. *Biol Reprod* 46, 686-91.
- Yanagimachi R 1969. *J Reprod Fertil* 18, 275-86.
- Yanagimachi R 1994. Raven Press: New York
- Yeagle PL 1991. *Biochimie* 73, 1303-10.

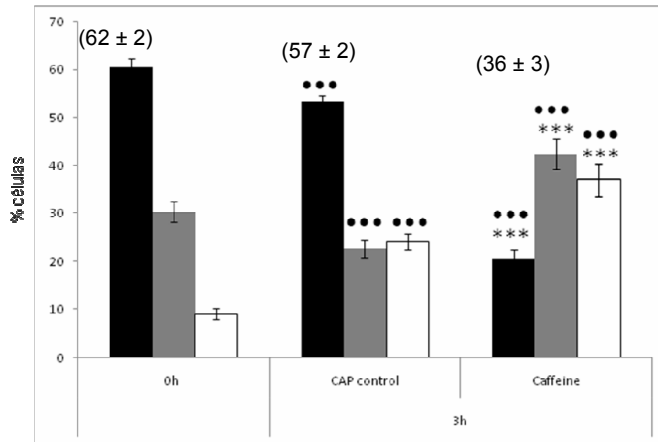


Fig. 1.- Valoración con CTC del estado de capacitación de espermatozoides ovinos tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes. Porcentaje de no capacitados (■), capacitados (▣) y reaccionados (□) en muestras control o incubadas con cafeína 10 mM. Valores medios (% ± SEM; control, n=32; cafeína, n=20). ***P<0,001 respecto a muestras control a 0 h; ***P<0,001 respecto a muestras control a 3 h. Arriba entre paréntesis, % viables (promedio ± SEM).

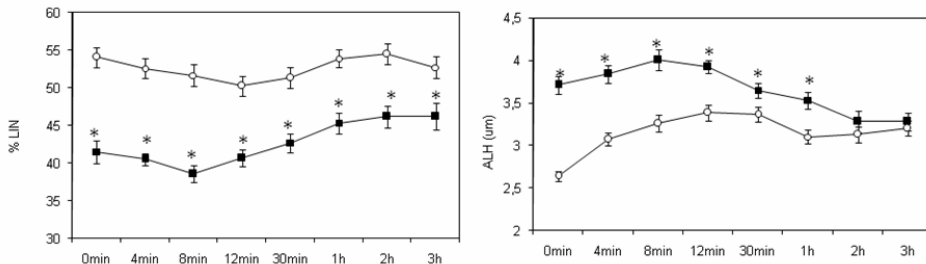


Fig. 2.- Evolución de los parámetros de motilidad en el transcurso de la incubación en condiciones capacitantes control —○— o en presencia de 10 mM cafeína —■—. Valores medios (% ± SEM; control, n=32; cafeína, n=20). * Indica diferencia significativa respecto del control.

Este trabajo se ha realizado gracias a las ayudas CICYT-FEDER AGL 2007-61229, CICYT-FEDER AGL 2008-01476, DGA A-26 y DGA 040/08. Los autores agradecen a ANGRA el suministro de sementales.

REGULATION OF RAM SPERM MOTILITY BY CALCIUM

ABSTRACT: Capacitated sperm display hyperactivated motility, characterized by deep and asymmetric waves, because of that they swim in circles or in figure-of-eight. Although capacitation and hyperactivation occurs at the same time, they might be regulated by different second messengers. Here, we report that caffeine, at a high concentration, can induce strongly hyperactivation and capacitation in ram sperm, according to motility, viability and CTC parameters.

Keywords: ram sperm, hyperactivation, caffeine.