

ENTRADA DE CALCIO EN ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS PORCINOS CAPACITADOS IN VITRO

C. Matás, M. Sansegundo, N.T. Atucha¹, L. Vieira, K. Avilés-López y S. Ruiz
Dpto. Fisiología (Facultad de Veterinaria. ¹Facultad de Medicina).
Universidad de Murcia. E-mail: cmatas@um.es <http://www.um.es/grupo-fisiovet>

INTRODUCCIÓN

Entre los sistemas de capacitación *in vitro* se encuentran los lavados espermáticos en distintos gradientes para seleccionar los espermatozoides de mayor calidad, la centrifugación para eliminar restos de plasma seminal, o la preincubación en el medio de FIV (Matás et al., 2003). Otros estudios realizados para optimizar la FIV se han basado en el uso de espermatozoides de distinto origen (epididimarios y eyaculados) y con distintos sistemas de conservación (frescos, refrigerados y congelados) (Rath y Niemann, 1997). Según algunos investigadores, los espermatozoides de epidídimo son más fáciles de capacitar que los eyaculados al no haber estado expuestos a los factores “decapitantes” del plasma seminal. Sin embargo, otros autores consideran que este hecho no es importante si, previo a la FIV, se elimina el plasma seminal (Yanagimachi, 1994). Estudios recientes sugieren que estos factores modulan el estado de capacitación espermática; sin embargo, sus efectos en la funcionalidad espermática, no están del todo claros debido a la alta variabilidad de la composición del plasma seminal entre especies, entre machos de la misma especie y entre eyaculados del mismo macho (Zhu et al., 2000).

De todos los mecanismos de señalización intracelular, el mejor estudiado es la movilización de Ca^{2+} . Esta vía consiste en aumentos transitorios de la concentración de calcio citosólico [Ca^{2+}] producidos por numerosos mensajeros intercelulares (señales de Ca^{2+}). La acción del Ca^{2+} sobre enzimas efectoras involucradas en la señal de transducción espermática (adenilato ciclasa, fosfodiesterasas nucleótido cíclicas) sugieren que este catión va a jugar un papel importante en la capacitación (Dragileva et al., 1999; Ho y Suarez, 2001). Muchos autores han mostrado la importancia del Ca^{2+} en la funcionalidad espermática (DasGupta et al., 1993; Fraser et al., 1995) y en la fosforilación de la tirosina de proteínas espermáticas (Visconti et al., 1995).

El objetivo de este trabajo fue determinar si las señales de Ca^{2+} en los espermatozoides epididimarios porcinos se encuentran afectadas por el procesado espermático previo a la FIV y/o por factores individuales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los espermatozoides procedían de cola de epidídimo de testículos de 7 verracos sacrificados en matadero. El transporte al laboratorio se realizó en recipiente isoterma en 1 h desde el sacrificio. Los testículos fueron lavados en solución salina atemperada procediéndose a la disección de la cola del epidídimo. Con una aguja (21G) en una jeringuilla de 5 ml se canalizó el conducto y se procedió a la introducción de aire para la obtención de los espermatozoides. Seguidamente se realizó una dilución 1:5 en PBS para su procesado. La vitalidad espermática se evaluó antes del inicio de cada experiencia siendo siempre superior al 95%.

Procesado de los espermatozoides para inducir la capacitación.

Las muestras espermáticas se procesaron según se describe a continuación:

- 1.- Espermatozoides no tratados (**NL**).
- 2.- Espermatozoides lavados en PBS (**PBS-BSA**), sometidos a 3 centrifugaciones (900 *g* x 10 min) y resuspendidos en PBS con 0.3% de BSA (fracción V, A-9647).

3.- Espermatozoides lavados en gradiente de Percoll® (**Percoll**). Las muestras espermáticas, se depositaron sobre columna de Percoll® de doble banda (45/70) y se centrifugaron (700 g x 30 min) a Tª ambiente.

En los tres casos se ajustó la concentración a 300x10⁶ esp/ml en PBS.

Determinación de la entrada de Ca²⁺ al espermatozoide por espectrofluorimetría.

Los espermatozoides se incubaron con Fura-2AM (2.5 µM) en PBS (45 min, 37°C). El Fura-2AM extracelular que no había ingresado en la célula se eliminó mediante centrifugación (700 g x 5 min). El *pellet* se resuspendió en PBS ajustando la concentración a 3 x 10⁶ esp/ml y se incubó durante 15 min, 37°C en ausencia de luz. Los espermatozoides se centrifugaron de nuevo (700 g x 5 min) y se resuspendieron en el medio capacitante TALP; la muestra se depositó en espectrofluorímetro (60 min) para la cuantificación de la fluorescencia (Sansegundo, 2008) y la posterior determinación de la concentración de Ca²⁺ (Gryniewicz et al., 1985).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El incremento de la [(Ca²⁺)_i] se vio afectado por el tratamiento y por el macho utilizado (p<0.001). Además, también hubo interacción del tratamiento x macho (p<0.001). La [(Ca²⁺)_i] (nM) en el grupo NL y Percoll fueron similares (116.77±3.49 y 121.67±3.53, respectivamente) siendo el grupo PBS-BSA el que presentó los niveles más bajos (83.49±3.55). Sin embargo, hubo dos machos en los que los valores de Ca²⁺ en el grupo PBS fueron más elevados que en los otros dos grupos. En estudios previos hemos demostrado que los niveles de Ca²⁺ en espermatozoides eyaculados sin lavar son similares a los epididimarios (lavados o no) y que los lavados en PBS-BSA o en Percoll son 10 veces superiores a los epididimarios (Sansegundo, 2008). Este hecho se puede atribuir a la presencia de ciertas proteínas de las glándulas accesorias que se unen al espermatozoide y facilitan la entrada de Ca²⁺ y otras proteínas que la inhiben y que serían eliminadas en su mayor parte mediante los lavados (Lusignan et al., 2007).

No obstante, al no estar presente esta secreción en los espermatozoides de epidídimo, no esperábamos que el tratamiento afectara a la cinética del Ca²⁺ tal y como ocurrió para los grupos NL y Percoll aunque nos sorprendió el resultado en el grupo PBS-BSA. Los motivos exactos que puedan explicar estos resultados no son conocidos, aunque podemos hipotetizar que la BSA en espermatozoides epididimarios modula la fluidez de la membrana de forma diferente a los eyaculados puesto que la composición proteica de la membrana de espermatozoides eyaculados y epididimarios es diferente y posiblemente se vea interferida de alguna manera la apertura de los canales de Ca²⁺. Por ello creemos necesaria la realización de más estudios que nos ayuden a comprender el efecto de la BSA sobre la membrana del espermatozoide epididimario.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DasGupta S, Mills CL, Fraser LR. J Reprod Fertil. 99: 135-143. 1993.
- Dragileva E, Rubinstein S, Breitbart H. Biol Reprod. 61: 1226-34. 1999.
- Fraser LR, Abeydeera LR, Niwa K. Mol Reprod Dev. 40: 233-41. 1995.
- Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. J Biol Chem. 260: 3440-50. 1985.
- Ho HC, Suarez SS. Biol Reprod. 65: 1606-15. 2001.
- Lusignan MF, Bergeron A, Crête MH, Lazure C, Manjunath P. Biol Reprod. 76: 424-32. 2007.
- Matás C, Coy P, Romar R, Marco M, Gadea J, Ruiz S. Reproduction. 125: 133-41. 2003.
- Rath D, Niemann H. Theriogenology. 47: 785-93. 1997.

- Sansegundo M. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. 2008.
- Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS et al. Development. 121: 1129-1137. 1995.
- Yanagimachi R. The Physiology of Reproduction. Knobil E, Neill JD (eds.) pp. 189-317. 1994.
- Zhu J, Xu X, Cosgrove JR, Foxcroft GR. Theriogenology. 54: 1443-1452. 2000.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido cofinanciado por AGL 2006-03-495 y por Fundación Séneca 08752/PI/08.

CALCIUM UPTAKE IN PORCINE EPIDIDYMAL SPERMATOZOA CAPACITATED IN VITRO

ABSTRACT: Recent studies suggest that decapacitation factors of seminal plasma could modulate sperm capacitation. Nevertheless, its effects in spermatid functionality are not completely clear due to the high variability of the composition of seminal plasma. Some enzymes involved in sperm transduction suggest that Ca^{2+} plays an important role in sperm capacitation. The aim of this work was to determine if Ca^{2+} signs in porcine epididymal sperm are affected by sperm process before IVF and/or by individual factors. Sperm samples were obtained of 7 epididymus boar, divided in 3 groups: 1. Not washed. 2. Washed in PBS. 3. Washed in Percoll's gradient. Samples were settled in spectrofluorimeter for $[(\text{Ca}^{2+})_i]$ determination. $[(\text{Ca}^{2+})_i]$ increase was affected by treatment and boar and there was interaction treatment x boar ($p < 0.001$). $[(\text{Ca}^{2+})_i]$ (nM) in groups 1, 3 were similar (116.77 ± 3.49 & 121.67 ± 3.53). Group 2 presented lowest levels (83.49 ± 3.55). Nevertheless, $[(\text{Ca}^{2+})_i]$ values in PBS group for 2 boars were higher than groups 1,3. Some sexual glands proteins could facilitate Ca^{2+} intake and others that disable them and that would be eliminated by washing. BSA in epididymal sperm could modulate fluency of membranes in different ways from ejaculated sperm and interfered the opening of Ca^{2+} channels.

Keywords: Calcium, epididymus, sperm, porcine