

EFFECTO DELBICARBONATO SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LA PROTEIN KINASA A (PKA) Y LA FECUNDACIÓN *IN VITRO* EN LA ESPECIE PORCINA

Soriano-Úbeda, C., Matás, C., García-Vázquez, F.A¹

Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia
Campus Mare Nostrum, 30100, Murcia e IMIB, Murcia. ¹fagarcia@um.es

INTRODUCCIÓN

El proceso de fecundación consiste en la unión de los gametos femenino y masculino para dar origen a un cigoto totipotente. Las interacciones a nivel celular y molecular, así como las condiciones físico-químicas del microambiente en el que la fecundación tiene lugar son muy complejas y no totalmente esclarecidas. Se sabe que los espermatozoides recién eyaculados no son capaces de fecundar, y requieren una serie de modificaciones en el tracto genital de la hembra para adquirir la habilidad de penetrar el ovocito (capacitación espermática). En este sentido, el fluido oviductal ofrece un ambiente esencial para que se desarrollen dichas modificaciones, ya que en su composición se encuentran moléculas como el bicarbonato (HCO_3^-) (Visconti, 2009), que en condiciones *in vivo* se presenta en un rango de concentración de 10 a 33mM (Rodríguez-Martínez, 2007). El HCO_3^- , además, se encuentra implicado en otros procesos relacionados con la capacidad de fecundación, como son los cambios de motilidad e hiperactivación del espermatozoide, y es uno de los principales responsables de la activación de la adenilatociclasa soluble presente en el espermatozoide, activando la vía de fosforilación de sustratos de la proteína kinasa A (PKA), los cuales son indicativos del estado de capacitación espermática (Visconti et al., 1999). El objetivo de este estudio fue intentar reproducir los acontecimientos que tienen lugar de manera fisiológica en torno a la fecundación y esclarecer los niveles de HCO_3^- óptimos para la capacitación espermática y fecundación *in vitro* (FIV) en la especie porcina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se extrajeron espermatozoides de la cola del epidídimo de cerdos sacrificados en matadero. Para ello y tras disección, se introdujo aire a presión en el conducto epididimario con un abboath adaptado a una jeringuilla hasta obtener una muestra de espermatozoides por el conducto deferente. Por un lado se estudió la activación de la PKA a través de la señal de fosforilación de los sustratos de PKA mediante western blot (WB). Para ello, las muestras de espermatozoides se incubaron durante 60 min en medio TALP de capacitación (Rath et al., 1999) con diferentes concentraciones de HCO_3^- (0, 15 y 25mM, siendo 25 mM la concentración habitual en los actuales sistemas de capacitación y fecundación *in vitro* en la especie porcina). Además, paralelamente se incubó una muestra de espermatozoides en un medio no capacitante (PBS). Por otro lado, se realizó la FIV de ovocitos porcinos madurados *in vitro* (n=606) en medio TALP con las diferentes concentraciones de HCO_3^- descritas anteriormente. A las 18 h de cocultivo, fueron fijados y teñidos con Hoechst, para posteriormente evaluar en cada grupo experimental y mediante microscopía de fluorescencia el porcentaje de penetración (%PEN), porcentaje de monospermia (%MON), número de espermatozoides por ovocito (SPZ/OVO) y el número de espermatozoides adheridos a la zona pelúcida (ZPBINDING).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de activación de PKA (fosforilación de los sustratos de PKA) mediante WB se muestran en la Figura 1 (A), así como la cuantificación de la señal en cada grupo experimental (Figura 1B). Se observa que las señales obtenidas en los grupos 15 y 25 mM no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p>0,05$) pero sí con respecto a los grupos PBS y 0 mM ($p<0,05$). De este modo, el HCO_3^- a una concentración de 15 mM produce una activación de PKA similar al habitualmente utilizado en los actuales sistemas de capacitación *in vitro* en la especie porcina (25 mM).

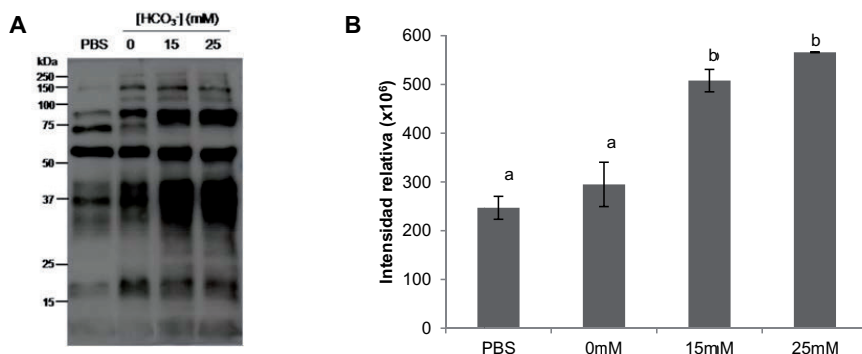


Figura 1. A) Inmunodetección de la fosforilación de los substratos de PKA mediante western blot en espermatozoides epididimarios incubados durante 60 min en medio TALP con diferentes concentraciones de HCO_3^- (0, 15 y 25 mM) y en medio no capacitante (PBS). B) Cuantificación de la intensidad relativa de señal obtenida en la inmunodetección de la activación de PKA en los diferentes grupos experimentales. El gráfico representa la media $\pm$ S.D. Diferentes letras (a, b) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Además, en los resultados obtenidos en la FIV (Tabla 1), los tres grupos experimentales muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p < 0,05$). Por un lado, la ausencia total de HCO_3^- hace imposible la penetración de ovocitos (0mM: 0 ± 0 %PEN) ya que para obtener una capacitación espermática, interacción espermatozoide-ovocito y fecundación correctas, el ión HCO_3^- es esencial (Harrison, 1996). Sin embargo, aunque los sistemas actuales de FIV porcina con 25 mM de HCO_3^- proporcionen un elevado %PEN ($97,42 \pm 1,14$), los resultados de monospermia y, por tanto, de éxito de la técnica de FIV y obtención de cigotos potencialmente viables, son muy bajos (%MON: $10,05 \pm 2,19$). Al reducir la concentración de HCO_3^- en el medio de FIV a 15 mM, observamos que aunque el %PEN es inferior ($79,61 \pm 2,81$) el %MON aumenta significativamente, lo que incrementa la eficiencia de la técnica en un 31% con respecto al grupo 25 mM.

Tabla 1. Parámetros de FIV de ovocitos porcinos con espermatozoides epididimarios en un medio con diferente concentración de HCO_3^- (0, 15 y 25 mM): % penetración (%PEN), % monospermia (%MON), n° espermatozoides por ovocito (SPZ/OVO) y n° espermatozoides unidos a la ZP (ZPBINDING). Los resultados se expresan como la media $\pm$ E.S. Diferentes superíndices (^a, ^b, ^c) en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

GRUPO	%PEN	%MON	SPZ/OVO	ZPBINDING
0mM (n=216)	0 ± 0^a	0 ± 0^a	0 ± 0^a	$0,29 \pm 0,04^a$
15mM (n=206)	$79,61 \pm 2,81^b$	$32,93 \pm 3,68^b$	$3,99 \pm 0,27^b$	$4,89 \pm 0,53^b$
25mM (n=194)	$97,42 \pm 1,14^c$	$10,05 \pm 2,19^c$	$6,72 \pm 0,37^c$	$8,94 \pm 0,72^c$

De este modo, 15 mM se postula como una concentración de HCO_3^- más adecuada para la FIV, ya que permite un mayor rendimiento en la obtención *in vitro* de cigotos monospermicos y, por tanto, de embriones potencialmente viables. Este hecho pone de manifiesto la necesidad de reajustar la concentración de HCO_3^- en los actuales sistemas de capacitación espermática y fecundación *in vitro* en la especie porcina, pues una concentración menor a la comúnmente utilizada es suficiente para optimizar el rendimiento de estas técnicas, lo que

podría suponer una mayor rentabilidad en los actuales sistemas de producción *in vitro* de embriones en la especie porcina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Harrison, R.A.P. 1996. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 8, 581-594. • Rath, D., Long, C.R., Dobrinsky, J.R., Welch, G.R., Schreier, L.L., Johnson, L.A. 1999. *In vitro* production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *J Anim Sci* 77, 3346-3352. • Rodríguez-Martínez, H. 2007. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology* 68, 138-143. • Visconti, P.E. 2009. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 667-8. • Visconti, P.E., Ning, X., Fornes, M. W., Alvarez, J. G., Stein, P., Connors, S. A., Kopf, G. S. 1999. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* 214, 429-443.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido subvencionado por el Ministerio de Economía y Competencia (MINECO) y por el Fondo de Desarrollo Regional Europeo (FEDER; código del proyecto, AGL2012-40180-C03-01).

EFFECT OF BICARBONATE ON PROTEIN KINASE A (PKA) ACTIVATION AND ON *IN VITRO* FERTILIZATION OUTPUT IN PORCINE

Abstract: Prior to their encounter with the oocyte, spermatozoa have to experiment some modifications to get the ability to fertilize the egg, the sperm capacitation. Some of the components of the oviductal fluid (such as HCO_3^-) play an essential role during sperm capacitation. This study attempts to apply the optimal HCO_3^- concentration during *in vitro* fertilization (IVF) process in porcine. First, the effect of different concentrations of HCO_3^- (0, 15 and 25 mM) on PKA substrates phosphorylation (indicative of capacitation) was evaluated in epididymal sperm; second, the IVF was performed with different HCO_3^- concentrations in order to improve the efficiency of viable zygotes production. The results showed that 15 mM of HCO_3^- produces a similar effect on sperm PKA activation ($p > 0.05$) that when 25 mM of HCO_3^- was achieved. Moreover, when 15 mM of HCO_3^- was used in IVF medium a greater efficiency was observed compared to other groups. Although 15 mM group offers less penetration (0 mM: 0 ± 0^a , 15 mM: 79.61 ± 2.81^b , 25 mM: 97.42 ± 1.14^c ; $p < 0.05$), the monospermy was the highest (0 mM: 0 ± 0^a , 15 mM: 32.93 ± 3.68^b , 25 mM: 10.05 ± 2.19^c ; $p < 0.05$). These facts could indicate the necessity of readjust the HCO_3^- concentration in the current systems of sperm capacitation and IVF in swine.

Keywords: bicarbonate, PKA, *in vitro* fertilization, porcine.