

CONTENIDO EN ACIDOS DOCOSAHEXAENOICO Y DOCOSAPENTAENOICO EN ESPERMATOZOIDES DE MAMIFERO: MARCADORES BIOQUIMICOS DE MADURACION ESPERMATICA

Mario Ollero y Juan G. Alvarez

Department of OB/GYN, Beth Israel Deaconess Medical Center
Harvard Medical School, Boston, MA (EEUU)

INTRODUCCION

En el semen de mamífero se desencadena de forma espontánea la producción de radicales de oxígeno y la consiguiente peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas espermáticas (1, 2), especialmente los ácidos docosapentaenoico (22:5n-6) (DPA) y docosahexaenoico (22:6n-3) (DHA). La tasa de peroxidación se halla correlacionada inversamente con la vida media del espermatozoide (1) y por ello se considera a este proceso una de las principales causas de reducción de la capacidad fertilizante de una muestra. El espermatozoide cuenta con un potente mecanismo antioxidante para controlar este proceso (3, 4). Sin embargo, la mayor o menor presencia en la célula del sustrato de la peroxidación (DHA y DPA), va a determinar el alcance de la reacción.

El espermatozoide de mamífero experimenta un proceso de remodelación lipídica de la membrana durante su maduración (5). Hasta ahora se admitía que dicha remodelación supone un descenso en el contenido total de ácidos grasos y un incremento en el de ácidos grasos poliinsaturados (6, 7, 8). Este incremento en la insaturación y, por tanto de la fluidez de la membrana, se considera esencial para el desarrollo de la motilidad y de la capacidad fusogénica de las membranas celulares que permite la reacción acrosómica. El objetivo de este trabajo fue determinar el contenido de ácidos grasos y DHA en muestras de distintas especies de mamíferos y en subpoblaciones celulares correspondientes a distintos estadios de maduración.

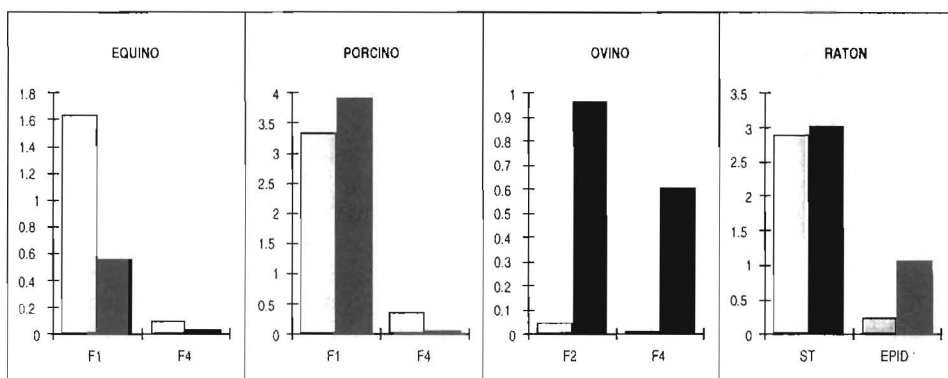
MATERIAL Y METODOS

Se analizaron muestras de semen de caballo, verraco, morueco y ratón. Las muestras equinas y porcinas fueron proporcionadas por las empresas Hamilton Thorne Research y Embryotech en el mismo día de su extracción, las primeras diluidas en un diluyente a base de leche y las segundas en un diluyente comercial. Las muestras ovinas fueron obtenidas y procesadas hasta la extracción de lípidos en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Zaragoza. Las células espermáticas y de la serie espermátogénica de ratón se obtuvieron a partir de testículos y epidídimo, mediante homogeneización de los órganos y lavado en medio HTF. Alícuotas representativas de cada muestra espermática de equino, porcino y ovino se cargaron sobre un gradiente discontinuo de Percoll de concentraciones 50, 70 y 95%, y se centrifugaron a 800 g durante 20 minutos. A continuación se recuperaron hasta 4 subpoblaciones espermáticas de cada muestra. La fracción número 1 se obtuvo de la interfase entre el plasma seminal (o el diluyente empleado en cada caso) y la capa de 50% de Percoll; la número 2, de la interfase entre las capas 50 y 70% de Percoll, la número 3 de la interfase entre 70% y 95% y la número 4 correspondió al pellet del gradiente. Tras someterse cada

subpoblación a un doble lavado en PBS, se extrajo la fracción lipídica mediante cloroformo-metanol 2:1 y se sometió a transmetilación con el reactivo NaOH/BF₃ metanólico. Los metil ésteres de ácidos grasos así obtenidos se analizaron mediante cromatografía de gases.

RESULTADOS Y DISCUSION

Tal y como sucede cuando se procesa semen humano mediante el mismo tipo de gradiente (9), se observó un incremento de la motilidad y un decremento de la proporción de células anormales de la fracción 1 a la fracción 4. Por tanto, se puede considerar el gradiente utilizado como un modelo in-vitro de maduración espermática, obteniéndose en la fracción 1 células inmaduras de origen testicular, y en la fracción 4 células maduras. El contenido total de ácidos grasos disminuyó de forma significativa entre la fracción 1 y la fracción 4 en todas las especies analizadas (de 18.24 nmoles/millón de células a 1.76 nmoles/millón en equino, de 105.46 nmoles/millón a 3.79 nmoles/millón en porcino y de 2.68 nmoles/millón a 1.41 nmoles/millón en ovino). Del mismo modo disminuyó el contenido de los ácidos DHA (de 0.563 nmoles/millón a 0.043 nmoles/millón en equino, de 3.93 nmoles/millón a 0.057 nmoles/millón en porcino, de 0.966 nmoles/millón a 0.61 nmoles/millón en ovino) y DPA (de 1.643 nmoles/millón a 0.1 nmoles/millón en equino, de 3.35 nmoles/millón a 0.358 nmoles/millón en porcino, de 0.047 nmoles/millón a 0.016 nmoles/millón en ovino) (ver figura). Con el fin de confirmar por medio de un modelo in-vivo los resultados obtenidos mediante el gradiente de Percoll, se aislaron células de túbulos seminíferos y de epidídimo de ratón y se analizó el contenido en los distintos ácidos grasos, obteniéndose que las células testiculares (espermatozonias, espermatozonos y espermátidas) poseen 3 veces más DHA (3.017 nmoles/millón frente a 1.065 nmoles/millón) y casi 15 veces más DPA (2.905 nmoles/millón frente a 0.238 nmoles/millón) que las células espermáticas de epidídimo (ver figura). Por otro lado, existe una alta variabilidad interespecífica en cuanto al perfil de ácidos grasos. Si bien el ácido graso saturado predominante en todas las especies estudiadas es el palmítico (52.69% en porcino, 62.87% en equino, 43.11% en ovino y 29.16% en ratón), los insaturados más comunes son el DHA en ovino (35.85%) y el DPA en equino (14.16%), mientras que se encuentran presentes aproximadamente en partes iguales en porcino (16.5 y 13.2% respectivamente), coincidiendo con los estudios publicados en este area (10). Estos resultados indican que (i) se produce un descenso en el contenido neto total en ácidos grasos y en el contenido en DHA y DPA conforme el espermatozoide transita desde los túbulos seminíferos hasta la cola del epidídimo, (ii) el contenido en DHA y DPA se podría utilizar como marcador bioquímico de maduración espermática, y (iii) la variabilidad interespecífica en el perfil de ácidos grasos podría contribuir a la distinta susceptibilidad a los procesos peroxidativos que tienen lugar en el espermatozoide durante la criopreservación.



Contenido en DHA (en negro) y DPA (en gris) en espermatozoides de equino, porcino, ovino y ratón, y de células redondas de túbulos seminíferos de ratón, en nanomoles de ácido graso por millón de células. F1, F2, F4: fracciones del gradiente de Percoll. ST: células redondas de túbulos seminíferos. EPID: espermatozoides de epidídimo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. J.G. Alvarez y B.T. Storey. Biol. Reprod. 1982, 27: 1102-1108.
2. J.G. Alvarez, D. Minaretzis, C.B. Barrett, J.F. Mortola y I.E. Thompson. Fertil Steril. 1996, 65: 400-5.
3. J.G. Alvarez, J.C. Touchstone, L. Blasco y B.T. Storey. J. Androl., 1987, 8: 338-348.
4. F. Tramer, F. Rocco, F. Micali, G. Sandri y E. Panfili. Biol. Reprod., 1998, 59: 753-758.
5. J.G. Alvarez y B.T. Storey. Mol Reprod Dev. 199, 42: 334-46.
6. R.W. Evans y B.P. Setchell. J Reprod Fertil. 1979, 57: 197-203.
7. R.W. Evans y B.P. Setchell. J Reprod Fertil. 1979, 57: 189-96.
8. J.E. Parks y R.H. Hammerstedt. Biol Reprod. 1985, 32: 653-68.
9. M. Ollero y J.G. Alvarez. 24th Annual Meeting American Society of Andrology. 1999. Louisville.
10. A. Poulos, A. Darin-Bennett, I.G. White. Comp Biochem Physiol [B]. 1973. 46:541-9.

Este trabajo ha sido realizado gracias a una beca postdoctoral concedida por la Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica del MEC.

Agradecemos la colaboración prestada por el laboratorio de Biología Espermiática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza.