

CINÉTICA DE LA ENTRADA DE CALCIO EN ESPERMATOZOIDES DE VERRACO CAPACITADOS IN VITRO

M. Sansegundo*, C. Matás*, N.T. Marín**, A. González***, S. Ruiz*

*Fisiología Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. **Fisiología Humana. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia. Complejo Espinardo. 30071. Murcia.

***Dpto. Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. Avda. Universidad. 10071. Cáceres. E-mail: sanse@um.es. <http://www.um.es/grupo-fisiovet/>

INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides de mamíferos necesitan experimentar una serie de cambios durante su transporte en el tracto genital femenino (Yanagimachi, 1994). Este proceso se conoce con el nombre de capacitación y engloba un conjunto de modificaciones tanto biofísicas como bioquímicas que van a conducir a los espermatozoides a su transformación en células capaces de unirse a la zona pelúcida, experimentar la reacción acrosómica, penetrar las envolturas del ovocito y finalmente formar el cigoto. La capacitación modifica la arquitectura intrínsecamente estable de la membrana espermática mediante la promoción de desórdenes lipídicos (De Lamirande et al., 1997), reorganiza o altera sustancias adsorbidas o integradas en la membrana plasmática durante la maduración en el epidídimo y propicia la exposición de una serie de receptores en ella, que posteriormente interactuarán específicamente con otros existentes en el ovocito (Yanahimachi, 1994). También se correlaciona con cambios en la concentración intracelular de determinados iones tales como el HCO_3^- , Na^+ , K^+ , destacando de entre ellos el papel del Ca^{2+} por su importancia. En el proceso de capacitación se produce un aumento en la síntesis de AMPc, estimulada por la actividad adenilatociclasa, y la inhibición de la actividad fosfodiesterásica que conducen a una elevación del Ca^{2+} intracitoplasmático (Breitbart, 2003).

El propósito de este estudio fue evaluar la cinética que sigue la entrada del ión Ca^{2+} en espermatozoides de verraco sometidos al tratamiento de capacitación in vitro mediante resuspensión en medio TALP (Rath et al., 1999).

MATERIAL Y MÉTODOS

El semen fue recogido de 4 verracos de fertilidad probada procedentes de una granja comercial. La fracción rica fue diluida 1:1 en BTS y transportada al laboratorio a una temperatura de 22°C. El semen diluido fue centrifugado para eliminar el sobrenadante (350xg, 4 min) y el sedimento fue resuspendido en medio no capacitante (NCM) (Tardif y Dubé, 2001) en el que se hizo la incubación para la carga con el indicador Fura-2AM (2.5 μM) en presencia de ácido plurónico (0.025% v/v), para una concentración espermática de 3×10^8 espz/ml, durante 45 min a 37°C en agitación. Transcurrido el período de incubación, se procedió a una nueva centrifugación para eliminar el exceso de fura del medio, y se resuspendió en NCM, incubando nuevamente a 37°C, 15 min para completar la desesterificación del fluorocromo a cargo de las esterasas citosólicas. Posteriormente, la muestra se centrifugó y el sedimento se resuspendió en medio TALP para iniciar el proceso de capacitación espermática,

considerándose este momento como “tiempo 0” para el análisis de la entrada de Ca^{2+} en los espermatozoides durante los ensayos.

Los cambios en la concentración de Ca^{2+} libre citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) pueden ser medidos empleando el fluorocromo Fura-2AM. Las muestras fueron analizadas mediante medición continua durante una hora a intervalos de un minuto, en un fluorímetro modelo “Aminco-Bowman Serie 2 Spectronic Unicam”, y el software utilizado para el análisis de la fluorescencia fue el “AB2 Luminiscence Spectrometer 5.31”. Para la monitorización de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ las suspensiones celulares fueron excitadas alternativamente a 340 y 380 nm, registrándose la fluorescencia emitida a 510 nm.

La $[\text{Ca}^{2+}]_c$ se calculó a partir del “ratio” de la fluorescencia emitida a las dos longitudes de onda de excitación (340/380), de acuerdo a la fórmula: $[\text{Ca}^{2+}]_c = Kd * ((R - R_{\text{min}}) / (R_{\text{max}} - R)) * Sf / Sb$, descrita por Grynkiewicz et al. (1985), considerando el valor de Kd para el fura-2AM de 224nM.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cinética de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ durante la hora de medición aparece reflejada en la Figura 1, donde se puede apreciar como la entrada de Ca^{2+} en los espermatozoides sigue una evolución ascendente conforme aumenta el tiempo. La media de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ obtenida para los distintos intervalos de tiempo (0-10, 11-20, 21-30, 31-40, 41-50 y 51-60 min) queda reflejada en la Tabla 1, habiéndose encontrado diferencias significativas ($p < 0.05$) para los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ entre todos los intervalos analizados.

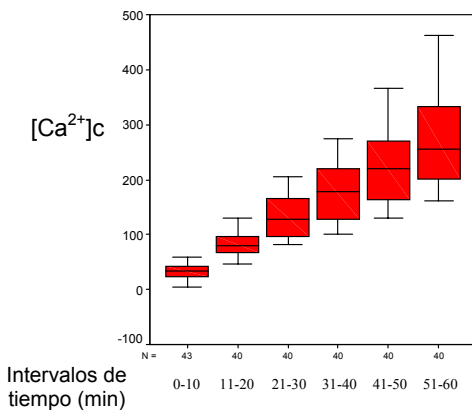


Figura 1. Estadísticos (media, desviación típica y rango) de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ según intervalos de tiempo.

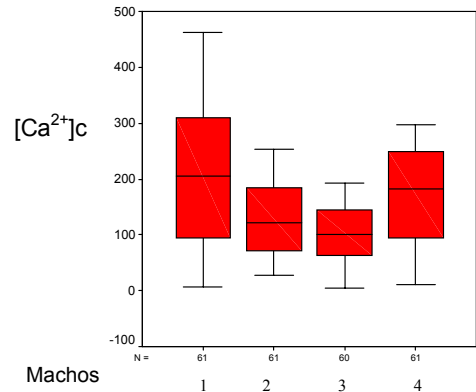


Figura 2. Estadísticos (media, desviación típica y rango) de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ de los 4 verracos estudiados.

Por otro lado, no se han encontrado diferencias en la interacción “macho x tiempo”, es decir, todos los individuos respondieron de forma similar dentro de los intervalos de tiempo analizados. Sin embargo, si existen diferencias entre verracos ($p < 0.05$), en cuanto a la concentración media de Ca^{2+} por animal (Figura 2), lo que

podría estar relacionado con algunas propiedades intrínsecas del individuo o bien con la tasa de fertilidad de los mismos. En otras especies, como la humana, se ha correlacionado la entrada de Ca^{2+} con la fertilidad (Harper et al., 2003). Sin embargo, en la especie porcina es necesario seguir realizando estudios en este sentido para determinar los motivos de estas diferencias.

Tabla 1. Medias y error estándar de la media (EEM) de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ para intervalos de tiempo.

Intervalos tiempo (min)	0-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60
$[\text{Ca}^{2+}]_c$	32.40	83.45	131.62	176.1	225.54	277.28
± EEM (nM)	± 2.28	± 3.60	± 5.89	± 8.31	± 10.76	± 14.49

La incubación de los espermatozoides en el medio TALP promueve ciertas modificaciones de la membrana plasmática de la célula. Así, la albúmina que contiene el medio favorece la salida del colesterol lo que hace aumentar la fluidez de la membrana y conlleva a la apertura de ciertos canales iónicos, como los del Ca^{2+} , permitiendo un aumento de su concentración en el interior celular. De este modo, durante la hora de medición, los espermatozoides mostraron un aumento paulatino de los niveles de Ca^{2+} intracelular al encontrarse dentro de un medio cuya composición favorece la capacitación y la reacción acrosómica. Entre los componentes de este medio, cabe citar también, el papel del HCO_3^- , indispensable en el proceso, y que actúa tanto, en el aumento del pH (Visconti et al., 1998) como en la activación del sistema adenilatociclasa (Okamura et al., 1988). Además, el medio TALP contiene una concentración de Ca^{2+} adecuada, necesaria para que tenga lugar todo el proceso.

Existe cierta controversia en cuanto al hecho de que es difícil diferenciar si los incrementos en la captación de Ca^{2+} por los espermatozoides de verraco son debidos a la capacitación o a la reacción acrosómica. Según algunas experiencias (Matás et al., 2003) los porcentajes de espermatozoides reaccionados a los 60 minutos de medida no fueron superiores a 1.11%. Estos datos nos hacen pensar que la mayor parte del Ca^{2+} captado por los espermatozoides es debida al proceso capacitativo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Breitbart H. 2003. Cell. Mol. Biol. 49: 3-10.
 De Lamirande et al. 1997. Mol. Hum. Reprod. 175-94.
 Gryniewicz et al. 1985. J. Biol. Biochem. 260: 3440-50.
 Harper et al. 2003. Biochem. J. 372: 407-417.
 Matás et al. 2003. Reproduction. 125: 133-141.
 Okamura et al. 1988. Biochem. Biophys. Res. Commun. 157: 1280-1287.
 Rath et al. J. 1999. Anim. Sci. 77: 3346-3352.
 Tardif y Dubé. 2001. Biol. Reprod. 65: 784-792.
 Visconti et al. 1998. Biol Reprod. 59: 1-6.
 Yanagimachi R. 1994. Physiology of Reproduction, Vol 1 (Eds. Knobil & Neil J), pages. 189-317.

Trabajo financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia. Proyecto AGL2003-03144.