

PATRONES DE FOSFORILACIÓN DE TIROSINA EN ESPERMATOZOIDES PORCINOS, EPIDIDIMARIOS Y EYACULADOS, CAPACITADOS *IN VITRO*

Avilés-López, K., García-Vázquez, F.A., Gadea, J. y Matas, C.

Departamento Fisiología. Facultad Veterinaria. Universidad de Murcia. 30100 Murcia.

España. E-mail: cmatas@um.es

INTRODUCCIÓN

Durante la capacitación espermática se producen numerosas modificaciones en el espermatozoide que le permiten finalmente ser "capaz" de fecundar. Entre estas modificaciones se encuentran cambios en las concentraciones iónicas intracelulares, en la fluidez y permeabilidad de membrana, en la movilización de calcio o en la fosforilación en tirosina de las proteínas (Saliccioni et al., 2007). La fosforilación en tirosina de las proteínas ha sido localizada en diversas regiones de las células espermáticas. La fosforilación a nivel del flagelo parece estar relacionada con la adquisición de la hipermotilidad (Petrunkina et al., 2003), mientras que la fosforilación en el área acrosomal pudiera estar correlacionada con la interacción con la zona pelúcida y la penetración del ovocito (Dubé et al., 2005). En el área ecuatorial, la fosforilación de tirosinas aparece en una zona triangular dentro del segmento ecuatorial, estando esta zona relacionada con la fusión de gametos (Jones et al., 2008). El objetivo de este trabajo ha sido definir y cuantificar la localización de la fosforilación de tirosina en espermatozoides porcinos, tanto epididimarios como eyaculados, antes y después de ser sometidos a un proceso de capacitación *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los espermatozoides epididimarios (**EP**) se obtuvieron de la cola del epidídimo de animales sacrificados en el matadero, mientras que los espermatozoides eyaculados (**EY**) se obtuvieron de verracos de fertilidad probada. Las muestras seminales se procesaron mediante un gradiente discontinuo de Percoll® (Matás et al., 2010). El sedimento resultante fue resuspendido en medio TALP y se incubó durante 3 h a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂. Se evaluó la fosforilación de tirosina antes de la capacitación (grupos control (C): EP-C y EY-C, inmediatamente tras diluir en medio TALP (grupos 0 h: EP-0 y EY-0) y tras estar en incubación durante 3 horas (grupos 3 h: EP-3 y EY-3). La localización de la fosforilación en tirosina de las proteínas de las muestras espermáticas se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta, según el protocolo descrito por Tardif et al. (2001). Las muestras se centrifugaron a 270xg durante 10 min y el sedimento se resuspendió en una solución de formaldehído al 2% (v/v) durante 1 h a 4 °C. Se centrifugó nuevamente y las muestras se resuspendieron en BSA-PBS al 5% (p/v) y se mantuvieron toda la noche a 4 °C en una cámara húmeda para bloquear uniones inespecíficas. Transcurrido este tiempo las muestras se centrifugaron y se resuspendieron en PBS. Se realizaron extensiones sobre un portaobjetos y se incubaron, durante 1 h a 4 °C, con el anticuerpo primario antifosfotirosina (4G10, Millipore, Temecula, CA, EEUU) a una dilución 1:300 en PBS-BSA al 1% (p/v). A continuación se realizaron dos lavados con PBS libre de calcio y magnesio, para luego incubar con el anticuerpo secundario anti-ratón producido en cabra conjugado con FITC (Biorad Laboratories, Madrid, España) diluido 1:400 en PBS-BSA al 1% (p/v) durante 1 h a 4°C. Finalmente se lavaron las muestras dos veces con PBS y se adicionó el medio de montaje fluorescente (Dako®, CA, EEUU). Se realizaron controles negativos de cada una de las muestras a procesar.

Las muestras se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia (Leica® DMR EEUU); a 100X aumentos con filtro I3 (excitación azul BP 450-490; emisión LP 515). El número de replicados fue de 6. Los espermatozoides (200 células por muestra) se clasificaron de acuerdo al patrón de fluorescencia. Los datos se expresaron como media ± error estándar de la media (SEM) y se analizaron por ANOVA, considerando el tratamiento espermático la variable principal. Cuando ANOVA señaló efecto significativo, los valores fueron reanalizados por el método de comparación múltiple de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a la tinción de diferentes partes del espermatozoide porcino existen hasta 8 patrones diferentes de fluorescencia correspondientes con la fosforilación de la tirosina

(Figura 1). Para simplificar el análisis y comparar nuestros resultados con los descritos por otros autores, los agrupamos en 3 grupos: grupo I: espermatozoides sin fluorescencia y/o poca fluorescencia (tipos A, D y H), grupo II: espermatozoides con fluorescencia en la región sub-ecuatorial y cola (tipos B y C) y el grupo III: aquellos que eran presentaban fluorescencia en el acrosoma, región sub-ecuatorial y la cola (tipos E, F y G (Figura 1). Los resultados muestran que el mayor porcentaje de espermatozoide sin fosforilar se encontraba en las muestras antes de ser capacitadas (grupos EY-C y EP-C, Tabla 1) y que la fosforilación aumenta al ser sometidos a los lavados en Percoll®. Al analizar los patrones de fosforilación en espermatozoides capacitados (grupos II y III) observamos que el tiempo de incubación no afectó a los espermatozoides de origen epididimario predominando los del grupo II, es decir espermatozoides que presentaron fosforilación principalmente en la región subecuatorial. Sin embargo, la distribución de la fosforilación en los espermatozoides eyaculados fue muy diferente a la que apareció en la de epidídimo. En primer lugar, el tiempo de incubación sí que influyó en la fosforilación de estos espermatozoides ya que el patrón II se incrementó desde el tiempo 0 al tiempo 3 horas de incubación. En relación al patrón III el efecto del tiempo afectó de forma inversa ya que al incrementar el tiempo disminuía este tipo de patrón, por lo que deducimos que se produce un cambio de fosforilación importante en espermatozoides eyaculados del tipo III al II durante el tiempo de incubación estudiado. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio cuando estudiamos la fosforilación de las tirosina mediante *Western-blot* en el que observamos que los espermatozoides EP no sufrían cambios significativos en la fosforilación de las proteínas a lo largo del tiempo de incubación (Avilés-López et al., 2009). Estos resultados sugieren que los patrones de fosforilación de tirosina se encuentran modulados por factores presentes en el plasma seminal. Ciertos componentes del plasma seminal protegerían a los espermatozoides eyaculados de la fosforilación. Sin embargo, cuando parte del plasma seminal es eliminado mediante la selección en el gradiente de Percoll®, el proceso de capacitación se ve favorecido. Estos resultados nos ayudan a explicar en cierta medida, los obtenidos en trabajos previos de fecundación *in vitro*, donde se observó que al utilizar espermatozoides eyaculados capacitados *in vitro* eran capaces de fecundar a los ovocitos mucho más rápido que los epididimarios bajo las mismas condiciones (Matás et al., 2010).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dubé, C., Leclerc, P., Baba, T., Reyes-Moreno, C., Bailey, J.L. 2005. *J Androl* 4: 519-528.
- Jones, R., James, P.S., Oxley, D., Coadwell, J., Suzuki-Toyota, F., Howes, E.A. 2008. *Biol Reprod* 79: 421-431.
- Matas, C., Sansegundo, M., Ruiz, S., García-Vázquez, F. A., Gadea, J., Romar, R., Coy, P. 2010. *Theriogenology* 8: 1327-1340.
- Petrunkina, A. M., Simon, K., Günzel-Apel, A. R., Töpfer-Petersen, E. 2003. *J Androl* 3: 423-437.
- Salicioni, A. M., Platt, M. D., Wertheimer, E.V., Arcelay, E., Allaire, A., Sosnik, J., Visconti, P.E. 2007. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65: 245-259.
- Tardiff, S., Dubé, C., Chevalier, S., Bailey, J.L. 2001. *Biol Reprod* 65: 784-792.
- Avilés-López, K., García-Vázquez, F. A, Matás C. 2009. *Reprod Fertil Dev* 21 (1): 211.

Agradecimientos: Trabajo financiado por Fundación Séneca 08752/PI/08.

Tabla 1. Patrón de fosforilación en tirosina en espermatozoides porcinos capacitados *in vitro* (se realizaron 6 replicados)

Origen/Tratamiento	Tipo I (%)	Tipo II (%)	Tipo III (%)
EP-C	32,00±7,35 ^b	0 ^a	68,00±7,35 ^{bc}
EP-0	12,88±2,12 ^a	81,50±7,05 ^c	5,00±5,00 ^a
EP-3	17,63±8,18 ^{ab}	81,63±8,04 ^c	0,75±0,48 ^a
EY-C	84,13±5,53 ^c	0 ^a	15,88±5,53 ^a
EY-0	11,25±6,58 ^a	8,25±4,96 ^{ab}	80,50±6,57 ^c
EY-3	4,13±1,68 ^a	42,13±16,66 ^b	53,75±18,32 ^b

Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

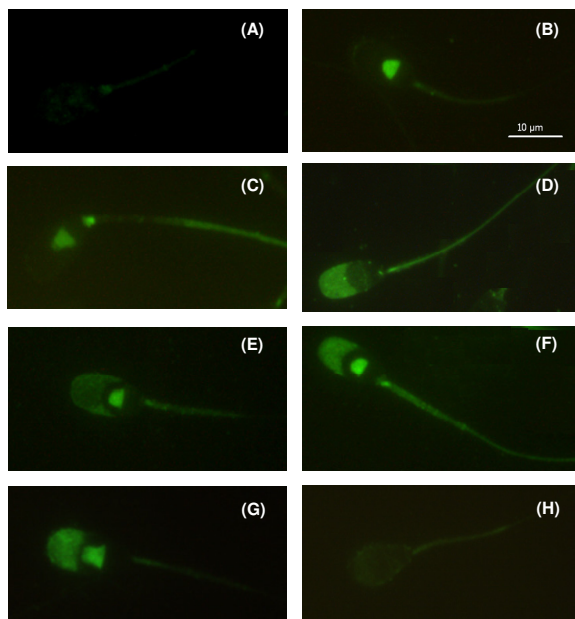


Figura 1. Patrones de fosforilación de espermatozoides porcinos de epidídimo y eyaculado no permeabilizados y evaluados mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). **(A)** Sin ninguna fluorescencia, **(B)** Fosforilación en región sub-ecuatorial, **(C)** Fosforilación en región sub-ecuatorial y flagelo, **(D)** Fosforilación en acrosoma y flagelo, **(E)** Fosforilación tenue en el acrosoma, triángulo y flagelo, **(F)** Fosforilación intensa en acrosoma, región sub-ecuatorial y flagelo; **(G)** Fosforilación en el acrosoma y región sub-ecuatorial, **(H)** Fosforilación ligera en el espermatozoide.

PATTERNS OF TYROSINE PHOSPHORYLATION IN BOAR EPIDIDYMAL AND EJACULATED SPERMATOZOA CAPACITATED *IN VITRO*

The aim of this study was to determine the P-tyrosine phosphorylation pattern in epididymal (EP) and ejaculated (EJ) spermatozoa before and after capacitation. Sperm samples were processed by Percoll gradient selection and incubation in TALP media up to 3 hours. After immunofluorescence staining we evaluated that presence of tyrosine phosphorylation was characterized in boar spermatozoa by a fluorescent signal presents in the equatorial subsegment, triangular in appearance. Before capacitation, the EJ spermatozoa presented a higher percentage of no phosphorylation than EP cells (EJ 84.13±5.53% vs. EP 32.00±7.35%, $P < 0.01$). After capacitation, the proportion of phosphorylated sperm increased in EP groups and this high level of phosphorylation was maintained from 0 to 3 hours of incubation. For EJ group at 3 h of co incubation has an increased of phosphorylated proteins in the group III and a decrease in the group II (42,13±16,66). The differences between EP and EJ before capacitation suggest that some components of the seminal plasma are implied in the sperm membrane stabilisation. However, the capacitation process is equally effective for both EP and EJ spermatozoa to induce phosphorylation signals. These results confirmed the previously results obtained by Western-blot analysis of the same samples.

Keywords: Sperm capacitation, tyrosine phosphorylation, immunofluorescence.