La actividad ATP-asa dependiente de Na^+ y K^+ interviene en la motilidad y la resistencia osmótica de los espermatozoides de morueco

S. Peris[1], D. Solanes[2], J.E. Rodríguez-Gil[1] y T. Rigau[1]
1. Unidad de Reproducción. Departamento de Patología y Producción Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. E-08193 Bellaterra.
2. Unidad de Producción Animal. Departamento de Patología y Producción Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. E-08193 Bellaterra.

INTRODUCCIÓN

El mantenimiento de los niveles iónicos intracelulares es uno de los mecanismos más importantes con los que cuenta el espermatozoide de mamífero para el mantenimiento de su funcionalidad. Así, se ha podido comprobar que la existencia de un flujo correcto de cationes como el Na^+ o el K^+ es vital en diversas especies para el control de la motilidad y la resistencia a cambios de osmolaridad (1-5), si bien no existe información detallada en los rumiantes. Este trabajo se ha centrado en estudiar el papel que asume la actividad ATP-asa dependiente de Na^+ y K^+, en la regulación de la motilidad y de la resistencia osmótica en espermatozoides frescos de morueco, con el fin de extender el conocimiento sobre el papel de estas actividades en la regulación de la funcionalidad de los espermatozoides maduros. Para ello, se han incubado espermatozoides de morueco sin diluir, en una solución isosmótica (298 $\forall$ 7 mOsm), una solución hiposmótica (103 $\forall$ 2 mOsm) y una solución hiperosmótica (2010 $\forall$ 11 mOsm) en presencia de ouabaína, un inhibidor específico de esta ATP-asa, observando el efecto del inhibidor sobre la viabilidad, la integridad acrosómica, la morfología de la cola y diversos parámetros de motilidad en las diversas condiciones estudiadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La incubación con ouabaína de eyaculados frescos durante 30 minutos produjo un incremento significativo en el porcentaje de acrosomas alterados y de deformación de las colas, así como una disminución en la motilidad total (porcentaje de espermatozoides que mostraron una velocidad curvilínea, VCL, mayor de 25 μm/sg) que fueron dependientes de la dosis de ouabaína (Tabla 1). Estos resultados se acompañaron con cambios significativos ($p+0,001$) en diversos parámetros de motilidad: Disminución del valor medio de VCL de la muestra, del coeficiente de linealidad (LIN) y de la frecuencia de batido de la cabeza (BCF) y un aumento en el desplazamiento medio de movimiento de la cabeza (HME; Tabla 1).

Resultados parecidos se observaron cuando los espermatozoides se incubaron durante 30 minutos con ouabaína, y posteriormente se incubaron otros 30 minutos en una solución isosmótica en presencia del inhibidor. Así se observó un incremento significativo en el porcentaje de acrosomas alterados y una disminución de la viabilidad (sólo a la concentración máxima de ouabaína) y la motilidad total. Igualmente, se observó una disminución del BCF y un incremento del HME, mientras que otros parámetros sufrieron cambios difíciles de interpretar (Tabla 2).

La incubación de los espermatozoides durante 30 minutos con ouabaína seguida de una incubación hiposmótica en presencia del inhibidor incrementó los porcentajes de acrosomas alterados y de colas deformadas, aunque estos efectos sólo fueron significativos a la máxima concentración del inhibidor (Tabla 3). En espermatozoides incubados en un medio hiperosmótico sólo se observó un incremento significativo en el porcentaje de acrosomas alterados, que fue dependiente de la concentración de ouabaína (Tabla 3).

Nuestros resultados muestran que la actividad ATP-asa dependiente de Na^+ y K^+ interviene parcialmente en el mantenimiento de la motilidad y en la resistencia a los cambios osmóticos de los espermatozoides de morueco. Los resultados recuerdan los descritos en espermatozoides porcinos (1,2), los cuales mostraron una resistencia a la ouabaína muy superior a la observada en otras especies. Este hecho indica la existencia de diferencias en la actividad ATP-asa entre especies de mamíferos. Hay que resaltar que son precisamente las especies con un volumen intracelular mayor, y que presentan un porcentaje de agua inmovilizada más alto las que muestran más resistencia a la ouabaína. Este hecho parece indicar que si bien la actividad ATP-asa es importante para establecer la resistencia espermática a los cambios osmóticos, otros factores, como el citado volumen acuoso, modulan de manera muy importante la

capacidad que tiene la ATP-asa de controlar el intercambio iónico y acuoso espermático. Teniendo en cuenta además, que la actividad ATP-asa genera una gasto considerable de energía en forma de ATP, no es extraño que en células con mayor volumen como la porcina o la ovina, y que por tanto necesitan una mayor actividad ATP-asa para equilibrar iónicamente el espermatozoide frente a cambios de osmolaridad, tenga otros mecanismos de equilibrio iónico menos onerosos para la célula, como podrían ser la difusión por gradientes sin gasto energético, como la bomba de Na^+ y H^+. Así pues, el equilibrio entre mecanismos consumidores de energía y mecanismos sin gasto energético es el punto esencial para entender los mecanismos activos de resistencia osmótica que presentan los espermatozoides de mamífero.

Hay que destacar también los efectos que genera la inhibición de la actividad ATP-asa sobre la motilidad. Se sabe que la motilidad espermática depende de la energía generada durante el ciclo de Krebs en las mitocondrias. Sin embargo, está menos clara la relación entre la generación mitocondrial de ATP y la modulación de la contractibilidad del flagelo mediante el gasto de energía producido por la actividad ATP-asa dependiente de Na^+ y K^+. Parece evidente que, al menos en el caso del morueco, y tal y como se ha observado en porcino, canino o equino (1,3), la actividad ATP-asa está interviniendo en el mantenimiento de una motilidad funcionalmente correcta, lo que lleva a suponer que la motilidad en estas especies no sólo depende de la capacidad que tenga el espermatozoide de producir energía a partir de azúcares, sino también de su capacidad de modular el gasto a través de cambios en las relaciones iónicas. Por tanto, no sólo la adición de monosacáridos, sino el mantenimiento de unos niveles iónicos y de pH correctos son fundamentales para el sostenimiento de una motilidad funcional.

BIBLIOGRAFIA

1.- Rodríguez-Gil JE y Rigau T (1996). Theriogenology 45: 873-888.
2.- Caiza de la Cueva FI, Rigau T, Pujol R, Piedrafita J y Rodríguez-Gil JE (1997). An. Rep. Sci. 48: 301-315.
3.- Caiza de la Cueva FI, Rigau T, Bonet S, Miró J, Briz M y Rodríguez-Gil JE (1997) Theriogenology 47: 765-784.
4.- Caiza de la Cueva FI, Pujol MR, Rigau T, Bonet S, Miró J, Briz M y Rodríguez-Gil JE (1997) Theriogenology 48: 947-968.
5.- Rodríguez-Gil JE, Montserrat A y Rigau T (1994) Theriogenology 42: 815-829.

TABLAS

Tabla1. Efectos de la ouabaína sobre el semen de morueco fresco

	CONTROL	10^{-7} M	10^{-6} M	10^{-5} M	10^{-4} M
VIABILIDAD (%)	93,9±0,8	93,6±0,9	92,7±1,4	94,7±0,5	96,4±0,3*
ACROSOMAS ALTERADOS (%)	8,3±0,7	17,6±1,2***	15,8±1,3***	23,5±1,7***	30,8±1,9***
COLAS ALTERADAS (%)	6,4±0,8	8,6±0,9*	7,7±0,9	10,0±0,9**	10,9±0,7***
MOTILIDAD TOTAL (%)	77,1±1,9	81,5±1,5	75,5±2,2	57,8±3,2***	51,4±3,6***
VCL (µm/sg)	101,2±3,8	110,7±3,3*	99,7±2,4	86,3±2,9***	90,8±4,7**
LIN (%)	60,0±1,7	60,1±1,6	58,9±1,5	52,1±2,1***	42,8±1,6***
DNC	629,8±43,6	551,3±35,1	495,8±24,4***	377,1±10,1***	471,3±32,6***
BCF (Hz)	13,32±0,26	13,19±0,23**	12,46±0,24**	12,14±0,19***	12,14±0,27***
HME (µm)	1,39±0,08	1,36±0,05	1,39±0,08	1,71±0,05***	1,91±0,11***

n=8. Datos como medias ± S.E.M. **:p<0,005. ***:p<0,001. Las diferencias se expresan frente al respectivo grupo Control.

Tabla 2. Efectos de la ouabaína sobre espermatozoides de morueco incubados en un medio isosmótico

	CONTROL	10^{-7} M	10^{-6} M	10^{-5} M	10^{-4} M
VIABILIDAD (%)	94,0±1,0	92,8±1,2	94,8±0,8	92,9±1,3	75,2±3,1***
ACROSOMAS ALTERADOS (%)	18,6±1,3	21,3±2,3	28,3±2,6***	24,8±2,8**	29,2±1,6***
COLAS ALTERADAS (%)	12,0±1,0	14,0±1,5	13,8±1,2	17,1±1,3**	13,3±1,6
MOTILIDAD TOTAL (%)	79,5±1,1	71,6±1,4***	71,6±1,4***	70,1±2,0***	53,6±3,2***
VCL (µm/sg)	91,1±3,4	87,1±2,5	94,5±3,5	92,2±2,3	85,2±2,8
LIN (%)	51,6±0,9	49,2±1,6	49,6±2,0	50,2±2,0	45,0±2,1**
DNC	606,2±36,8	551,3±35,1	423,8±28,8***	370,6±22,9***	387,0±19,7***
BCF (Hz)	13,84±0,25	13,19±0,23	13,49±0,38	12,60±0,11***	12,93±0,27**
HME (µm)	1,29±0,06	1,36±0,05	1,36±0,03	1,50±0,06**	1,63±0,05***

n=8. Datos como medias ± S.E.M. **:p<0,005. ***:p<0,001. Las diferencias se expresan frente al respectivo grupo Control.

Tabla 3. Efectos de la ouabaína sobre espermatozoides de morueco incubados en medios hipo- e hiperosmótico

MEDIO HIPOSMOTICO					
	CONTROL	10^{-7} M	10^{-6} M	10^{-5} M	10^{-4} M
VIABILIDAD (%)	94,0±1,1	91,9±1,5	92,7±1,4	92,6±1,3	92,3±1,1
ACROSOMAS ALTERADOS (%)	31,8±2,4	34,2±2,3	31,5±2,5	41,7±3,0***	43,4±3,4***
COLAS ALTERADAS (%)	38,0±2,3	38,6±2,7	36,3±2,5	39,3±2,1	44,12,0**
MEDIO HIPEROSMOTICO					
	CONTROL	10^{-7} M	10^{-6} M	10^{-5} M	10^{-4} M
VIABILIDAD (%)	96,6±0,3	94,0±1,2*	95,6±0,6	95,0±0,8	94,6±0,8*
ACROSOMAS ALTERADOS (%)	13,8±1,2	14,6±1,1	18,9±1,6**	18,9±1,9**	23,6±2,5***
COLAS ALTERADAS (%)	7,9±0,7	8,0±0,6	7,9±0,7	7,2±1,0	8,2±1,1

n=8. Datos como medias ± S.E.M. *:p<0,01. **:p<0,005. ***:p<0,001. Las diferencias se expresan frente al respectivo grupo Control.