UNIÓN A ZONA PELÚCIDA DE ESPERMATOZOIDES OVINOS SELECCIONADOS POR SWIM-UP/DEXTRANO

Colás, C., Casao, A., Abecia, A., Forcada, F., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T.
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.

INTRODUCCIÓN

El espermatozoide de mamíferos recién eyaculado no puede fecundar al ovocito. Para que adquiera capacidad fecundante ha de sufrir una serie de procesos de tipo bioquímico y cambios en el patrón del movimiento del flagelo que le permiten al espermatozoide alcanzar la capacidad de sufrir la reacción acrosómica, mediante la cual liberará el contenido del acrosoma para poder fusionarse con el ovocito (Benoff,1993; De Jonge,1999; Yeagle,1991). El proceso de swim-up/dextrano permite seleccionar espermatozoides libres de plasma seminal con alta motilidad y viabilidad (García-López *et al.,* 1996). En trabajos anteriores hemos demostrado que la tasa de fertilidad obtenida mediante inseminación intrauterina de muestras seleccionadas en ausencia de calcio y bicarbonato (SW-) fue significativamente mayor que la de muestras seleccionadas con ambos compuestos, cuando la ovulación y la inseminación no estaban bien sincronizadas (Grasa *et al.,* 2004). Con objeto de comprobar si esa diferencia podría deberse a que el proceso de swim-up con calcio y bicarbonato indujera la capacitación, en este estudio se han comparado muestras SW- a 0 horas y después de 3 y 4 h de incubación con 5% CO_2 a 39 ºC, sin y con adición de agentes capacitantes. En todos los casos se ha valorado motilidad, integridad de membrana, estado de capacitación (mediante tinción con clorotetraciclina (CTC), y tasa de unión a zona pelúcida (ZBA). Además, y dado que hemos comprobado que la capacitación aumenta la fosforilación de residuos de tirosina de determinadas proteínas de la membrana espermática (Grasa *et al.,* 2004), hemos analizado los cambios en el patrón de fosforilación mediante Western-blotting.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la obtención del semen, mediante vagina artificial, se emplearon moruecos adultos entre 2 y 4 años, pertenecientes a la Asociación Nacional de Criadores de Ganado selecto de la raza Rasa Aragonesa pertenecientes a ANGRA, estabulados en la Facultad de Veterinaria bajo condiciones nutricionales uniformes. Con el objetivo de eliminar las diferencias individuales, para cada ensayo, se utilizó una mezcla de los segundos eyaculados de cuatro moruecos. Los experimentos se realizaron manteniendo los animales con un periodo de abstinencia de dos días, de acuerdo con estudios previos (Ollero *et al.,* 1996).

La metodología utilizada tanto para la selección de las muestras de espermatozoides por un método de swim-up/dextrano, su evaluación, la inducción de la capacitación y su valoración mediante la tinción con clorotetraciclina (CTC), la obtención de proteínas del plasma seminal y su aislamiento, así como la inmunodetección mediante Western-blotting, fue la descrita previamente (Pérez-Pé *et al.,*2002), y la unión a zona pelúcida (ZBA) utilizando ovocitos homólogos según el protocolo descrito (Pérez-Pé et al., 2000). El medio capacitante estaba compuesto por NaCl 100 mM, KCl 3,1 mM, $NaHCO_3$ 25 mM, $CaCl_2.2H_20$ 2 mM, NaH_2PO_4 0,3 mM, $MgCl_2.6H_2O$ 0,4 mM, HEPES 10 mM, piruvato sódico 1 mM, lactato sódico 21,6 mM, glucosa 5 mM, BSA 5 mg/ml, pH 7,2. La mezcla de aditivos contenía metil-b-ciclodextrinas 2,5 mM, teofilina 1 mM, cafeína 1 mM, ácido okadaico 0,2 µM, db-cAMP 1 mM. La motilidad espermática se valoró utilizando un Sistema Computerizado de Análisis Seminal (PROISER).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Fig. 1 refleja el estado de capacitación de espermatozoides seleccionados por un proceso de swim-up/dextrano en ausencia de calcio y bicarbonato (SW–) después de la adición de calcio y bicarbonato (control), y el efecto de la adición de agentes capacitantes (aditivos) y la incubación con 5% CO_2 a 39 ºC. Puede observarse que la proporción de

espermatozoides capacitados en las muestras control no era muy alta (26,7%) y que aumentó ligeramente durante la incubación. Sin embargo, los aditivos produjeron un aumento muy significativo del porcentaje de espermatozoides capacitados inmediatamente después de su adición. Después de la incubación en condiciones capacitantes comprobamos que la proporción de capacitados se mantuvo mientras que el porcentaje de reaccionados aumentó.

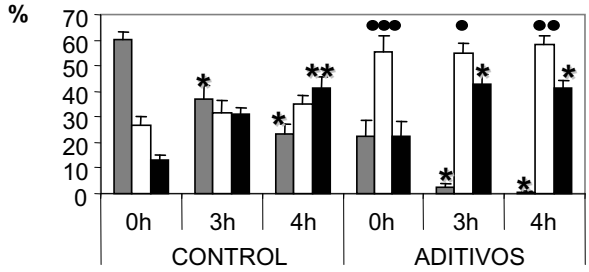


Fig. 1.- Valoración con CTC del estado de capacitación de espermatozoides ovinos. Porcentaje de no capacitados (■), capacitados (□) y reaccionados (■) en muestras control (swim-up- con adición de 4 mM calcio y 25 mM bicarbonato), y en presencia de aditivos, incubadas 3 o 4 h con 5% CO_2 a 39 ºC. Valores medios (% ± SEM, n=7). * P<0,001 respecto a muestras control a 0 h; • P<0,05, ••P<0,01, •••P<0,001 respecto a muestras con aditivos a 0 h.

Los cambios en los patrones de CTC no se corresponden con los cambios observados en la motilidad (Fig. 2). Los aditivos no produjeron un aumento inmediato de los espermatozoides con motilidad progresiva, aunque redujeron significativamente el número de estáticos producidos durante la incubación, aumentando los mótiles (Fig. 2a). Es importante resaltar que el mayor porcentaje de rápidos se encontró en las muestras con aditivos después de 3 horas de incubación, significativamente mayor que el obtenido después de 4 horas (Fig. 2b).

La capacidad de unión a zona pelúcida de ovocitos homólogos (Tabla 1) de la muestra control (t=0) aumentó después de 3 horas de incubación (P < 0.05). Estos resultados indican que la muestra obtenida por swim-up no está capacitada, y que la adición de calcio y bicarbonato no produjo un aumento inmediato en la capacitación, lo que concuerda con los resultados de la tinción con CTC (Fig. 1). Los aditivos no produjeron un aumento inmediato de la unión a zona pelúcida, a diferencia de lo observado en el patrón de CTC. Sin embargo, después de 3 h de incubación, los resultados de ZBA fueron mayores en la muestra con aditivos, tanto respecto a la misma muestra a 0 h (P < 0,005), como a la muestra control a las 3 h de incubación (P<0,05). Estas diferencias fueron menores después de 4 h de incubación (Tabla 1).

Tabla 1.- Unión a zona pelúcida (ZBA) de ovocitos homólogos de muestras control y con aditivos

	Espermatozoides por ovocito		
	0 horas	3 horas	4 horas
Aditivos	5,25 ± 0,431^{b,c}	9,34 ± 0,918^{a}	7,38 ± 0,982
Control	4,7 ± 0,56^{c}	6,21 ± 0,418^{b}	5,78 ± 0,499

Valores medios de espermatozoides unidos por ovocito ± SEM (n=3). Diferentes superíndices tanto en filas como en columnas indican diferencias significativas: a, b: P < 0,005; b,c: P < 0,05.

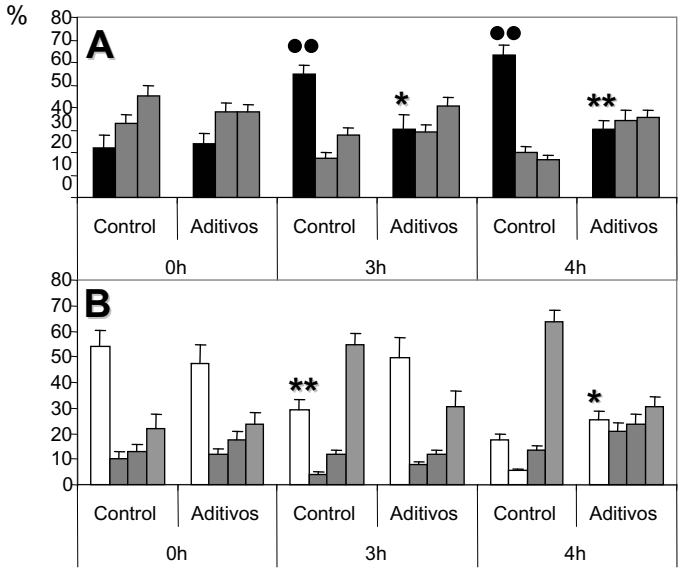


Fig. 2.- Parámetros de motilidad valorados con SCA. Muestras control (swim-up- con adición de 4 mM calcio y 25 mM bicarbonato), y en presencia de aditivos, incubadas 3 o 4 h con 5% CO_2 a 39 ºC. Valores medios ± SEM (n=7). Porcentaje de espermatozoides A) estáticos (■), móviles no progresivos (■), móviles progresivos (■); B) rápidos (□), medios (■), lentos (■), estáticos (■). ●●P<0,001 respecto a muestras control a 0 h; * P<0,05 respecto a muestras control a 3 y 4 h.

El examen de los patrones de fosfotirosina mediante western-blotting puso de manifiesto que esta fosforilación aumenta después de 3 h de incubación en presencia de aditivos, tanto respecto a las muestras control como a las que llevan aditivos a 0 h. Además, se encontró una correlación significativa (R=0,8534, P<0,05) entre el aumento en la señal de fosfotirosinas y los resultados de ZBA.

En definitiva, los resultados de este estudio ponen de manifiesto que los espermatozoides seleccionados por swim-up/dextrano en ausencia de calcio y bicarbonato no están capacitados, y que la adición de activadores de la Proteín Kinasa A estimula la capacitación de espermatozoides ovinos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Benoff S. 1993. Hum Reprod 8: 2001.
- García-López N, Ollero M, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 1996.Theriogenology 46: 141-151.
- Grasa, P., Pérez-Pé., R., Báguena, O., Forcada, F., Abecia, A., Cebrián-Pérez, J. A., Muiño-Blanco, T. 2004. J Androl 25: 982-990.
- De Jonge CJ. 1999. J Androl 20: 463-473.
- Ollero M, Muiño-Blanco T, López-Pérez M, Cebrián-Pérez JA. 1996. Int J Androl 19: 287-292.
- Pérez-Pé, R., Fernández-Juan, M., Peleato, M. L., Cebrián-Pérez, J. A., Muiño-Blanco, T. 2002. Mol Reprod Dev 61: 226-233.
- Pérez-Pé, R., Strom-Holst, B., Muiño-Blanco, T., Soderquist, L., Rodríguez-Martínez, H. 2000. 14th International Congress on Animal Reproduction (ICAR). Estocolmo, (Suecia), 2000: "*Development of a sperm zona pellucida binding assay for ram semen".*
- Yeagle PL. 1991. Biochimie 73: 1303-1310

Este trabajo se ha realizado gracias a las ayudas **CICYT-FEDER AGL 2004-02882, INIA RZ03-035, DGA GC-2005-027 and CICYT-FEDER AGL 2005-02614**.