ESTUDIO DE LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA *IN VITRO* EN ESPERMATOZOIDES EYACULADOS Y EPIDIDIMARIOS

Matás, C., García-Vázquez, F., Sansegundo, M., Gadea, J., Coy, P., Ruiz, S.
Dpto. Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia. cmatas@um.es
http://www.um.es/grupo-fisiovet

INTRODUCCIÓN

La capacitación espermática se puede definir como el conjunto de modificaciones a nivel molecular que ocurren en el espermatozoide, después de la maduración en el epidídimo, y que le confieren la capacidad de fertilizar al ovocito. *In vitro*, este proceso puede ser mimetizado eliminando el plasma seminal por distintos sistemas de lavado e incubando a los espermatozoides en medios de composición comparable a la del fluido oviductal (revisado por Visconti *et al.,* 2002). Entre los tratamientos espermáticos utilizados habitualmente en los laboratorios se encuentran los lavados que se realizan con medios con albúmina o a través de centrifugaciones en un gradiente de Percoll®. En la mayoría de los casos, el medio de capacitación contiene sustratos energéticos (piruvato, lactato, glucosa), un aceptor de colesterol (normalmente albúmina), bicarbonato y calcio, además de determinados electrolitos. El mecanismo por el cual estos componentes promueven la capacitación sigue siendo motivo de estudio. Parte del proceso ha podido ser identificado, ya que se ha determinado una correlación entre la capacitación y la salida de colesterol de la membrana plasmática, lo que conlleva un incremento en la fluidez de la misma, con una modificación en la concentración de iones y una hiperpolarización de la membrana. Todo ello es necesario para que se produzca una hiperactivación espermática y finalmente la reacción acrosómica.

El objetivo de este trabajo ha sido mostrar de forma conjunta las experiencias desarrolladas por nuestro grupo para caracterizar el proceso de capacitación, inducido mediante distintos tratamientos, en espermatozoides porcinos eyaculados y en espermatozoides obtenidos de epidídimo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los espermatozoides eyaculados se obtuvieron a partir de verracos de fertilidad probada. Los espermatozoides de epidídimo procedían de animales sacrificados en matadero. Solamente se utilizaron los espermatozoides de la cola del epidídimo. Se realizaron tres tratamientos de capacitación (Matás *et al.,* 2003): A) espermatozoides lavados a través de un gradiente de Percoll® (45 y 90% ó 45 y 75% v/v para espermatozoides eyaculados y epididimarios, respectivamente), B) espermatozoides lavados en medio PBS con un 0'1% de BSA, y C) espermatozoides en los que mediante una centrifugación suave se eliminó el plasma seminal o la secreción procedente de epidídimo, denominados como "no lavados" (NL). Posteriormente, todas las muestras espermáticas se resuspendieron en medio de fecundación TALP.

Para la determinación de la capacitación espermática utilizamos la medición de los siguientes parámetros (Gadea *et al.,* 2005):

- Desorden lipídico de la membrana plasmática evaluado mediante citometría de flujo de espermatozoides teñidos con merocianina 540 y Yo-Pro.
- Incremento de los niveles de calcio evaluado mediante fluorometría utilizando fluorocromo Fura-2 (Harper *et al.,* 2003; Sansegundo *et al.,* 2005).

- Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) de los espermatozoides marcados con el fluorocromo H_2DCFDA y evaluados mediante citometría nivel de flujo.
- Parámetros de motilidad espermática determinados por CASA.
- Reacción acrosómica, evaluada mediante citometría de flujo utilizando lectina PNA e ioduro de propidio.
- Penetración *in vitro* homóloga con ovocitos madurados *in vitro* cocultivados durante 2 y 4 horas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los **lípidos de membrana** se vieron modificados tanto por el origen de los espermatozoides como por el tratamiento al que éstos fueron sometidos. Los espermatozoides epididimarios presentaron un mayor porcentaje de células viables y con bajo desorden lipídico que los espermatozoides eyaculados. Dentro de los epididimarios el tratamiento con BSA supuso una reducción de la viabilidad espermática en comparación con el Percoll® y el no lavado (% de muertos: BSA 43'45a *vs.* Percoll® 35'75b y NL 31'85c, p<0'05). Pero fue el NL el tratamiento que mantuvo una mayor proporción de membranas con lípidos estables. (NL 22'76a, BSA 15'85b y Percoll® 19'71b, p< 0'05).

El nivel de **calcio intracelular** se incrementó en todos los grupos durante el tiempo de incubación en el que realizamos el estudio aunque sin seguir la misma cinética. En términos generales, la concentración media en los espermatozoides eyaculados fue superior a la de espermatozoides de epidídimo (472'27 *vs.* 101'84 nM), y los espermatozoides lavados con BSA-PBS o bien con Percoll® fueron los que presentaron los niveles más altos (660´42 *vs.* 604´12 nM).

La producción de **ROS** (medida en unidades de fluorescencia) fue incrementando a lo largo del tiempo de incubación y estuvo afectada por el tratamiento espermático y por el origen de los espermatozoides. Los espermatozoides eyaculados produjeron la mayor cantidad de ROS (14´20 *vs.* 9´80), y dentro de éstos, los lavados con Percoll®.

En lo referente a la **motilidad**, encontramos que los valores para todos los parámetros analizados fueron mayores para los espermatozoides epididimarios. En cuanto al efecto que tuvo sobre ellos el tratamiento espermático, independientemente del origen de los espermatozoides, observamos que solo existieron diferencias para velocidad curvilínea (VCL), linealidad (VCL) y rectitud (STR) entre los espermatozoides lavados con Percoll® y los otros dos grupos.

La **reacción acrosómica** se vio influenciada tanto por el tratamiento como por el origen de los espermatozoides, de manera que el mayor porcentaje de espermatozoides reaccionados se obtuvo en el grupo de eyaculados, y dentro de éstos, en los que habían sido lavados con BSA.

Los resultados de **FIV** mostraron que a las 2 horas de cocultivo la penetración espermática fue significativamente superior cuando los espermatozoides eyaculados habían sido lavados a través de un gradiente de Percoll®, siendo similar para el resto de grupos. Cuando se dejaron transcurrir 4 horas de cocultivo, los resultados de penetración de espermatozoides de epidídimo fueron muy superiores a los eyaculados, salvo para el caso de aquellos que se lavaron a través de un gradiente de Percoll®. Además, el mayor número de espermatozoides por ovocito se obtuvo con espermatozoides eyaculados lavados a través de gradiente de Percoll®.

Dependiendo del tratamiento al que se somete a los espermatozoides, sea cual sea el origen de éstos o con qué parámetro determinamos el grado de capacitación espermática, el resultado que obtenemos es diferente. Por tanto, bajo nuestra opinión, aunque todos los parámetros utilizados evalúan la capacitación, cada uno de ellos de forma aislada no discrimina cual es el tratamiento con el que mejor capacitamos la muestra. Hay autores que opinan que los espermatozoides procedentes de epidídimo se capacitan más fácilmente que los eyaculados (Yanagimachi, 1994), lo que corrobora los resultados de penetración cuando el cocultivo se realiza durante 4 horas para espermatozoides de epidídimo, pero no para espermatozoides eyaculados lavados con Percoll®. Sin embargo, según esta teoría, los espermatozoides de epidídimo deberían ser capaces de penetrar más rápidamente que los eyaculados y esto no ocurre cuando el cocultivo es de 2 horas, donde la máxima penetración se obtiene con espermatozoides eyaculados lavados con Percoll®. Además, los niveles de calcio intracitoplasmáticos, o la producción de ROS, fueron mas elevados en espermatozoides eyaculados que en espermatozoides de epidídimo. Por ello, pensamos que los espermatozoides eyaculados son más fáciles de capacitar que los de epidídimo bajo determinados sistemas de capacitación. Una explicación a este hecho puede encontrarse en los recientes resultados de Lusignan *et al.* (2006), que demuestran que ciertas proteínas del plasma seminal del verraco (similares a las BPS en toro) estimulan la capacitación de los espermatozoides al inducir la salida de colesterol y de fosfolípidos de la membrana espermática. De esta forma, cabe entender que el plasma seminal parece poseer algunas características que facilitan la capacitación de los espermatozoides cuando éstos son lavados posteriormente a través de un gradiente de Percoll®.

Financiado con proyecto AGL2003-03144.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gadea J, Gumbao D, Matás C and Romar R. 2005. J. Androl. 26: 749-756.
- Harper C, Kirkman-Brown J, Barratt C, Publicover SJ. 2003. Biochem. J. 372:407-417.
- Lusignan MF, Bergeron A, Crête MH, Lazure C, Manjunath P. 2006. Biol. Reprod. (Paper in Press).
- Matás C, Coy P, Romar R, Marco M, Gadea J and Ruiz S. 2003. Reproduction. 125 133-141.
- Sansegundo M, Matás C, Marín NT, Gonzalez A, Ruiz S. 2005. ITEA 26:334-336
- Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S and Diezman AB. 2002. J. Reprod. Immunol. 53:133-150.
- Yanagimachi R. 1994. In: Knobil, E., Neill, JD (Eds.). vol. 1. Raven Press, New York, pp.189-317.