FOSFORILACIÓN DE TIROSINA EN ESPERMATOIDES PORCINOS INCUBADOS EN EXPLANTES OVIDUCTALES: EFECTO DEL LAVADO ESPERMÁTICO

Luño[1], V., López-Úbeda[2], R., García-Vázquez[2], F.A. y Matás[2], C.

[1]Dpto. Patología Animal (Área de Reproducción y Obstetricia).Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.[2] Depto. Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus *Mare Nostrum*, 30100 Murcia. cmatas@um.es

INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides en su tránsito por el tracto genital de la hembra van perdiendo los factores decapacitantes adquiridos del plasma seminal y como consecuencia comienzan a capacitarse, requisito necesario para que se produzca la fecundación. En el caso de la fecundación *in vitro*, se intentan imitar en el laboratorio aquellos procesos que tienen lugar de manera natural, como por ejemplo el procesado de los espermatozoides. La preparación espermática para capacitar los espermatozoides *in vitro* se ha realizado de diferentes maneras (Matás *et al*., 2003), siendo uno de los objetivos principales la eliminación del plasma seminal.

De la misma forma, mediante cultivos *in vitro* de células oviductales porcinas se ha intentado simular las condiciones que los espermatozoides encuentran en el tracto genital femenino y que les permite capacitarse. Las modificaciones producidas por este proceso tienen varias consecuencias en el gameto, siendo una de las más importantes el aumento los niveles de fosforilación en tirosina de las proteínas (Visconti *et al.,* 1995). Se ha determinado que el mayor porcentaje de espermatozoides unidos a las células oviductales presentan un nivel bajo de fosforilación en tirosina y de calcio intracelular en diferentes especies, representando la población más viable destinada a la fecundación (Petrunkina *et al.,* 2001). También se han analizado a los espermatozoides *in situ* tras inseminaciones en cerda y vaca, demostrándose interacciones entre el epitelio y la membrana plasmática espermática en la zona caudal del istmo (Hunter, 1991). Estas experiencias han sido utilizadas para estudiar diferentes características espermáticas, pero nunca para determinar el estado de fosforilación en tirosina de las proteínas espermáticas.

El objetivo de este trabajo ha sido caracterizar la influencia del lavado a través de gradientes de Percoll en la expresión de los diferentes patrones de fosforilación en tirosina de las proteínas de espermatozoides de verraco incubados en explantes oviductales porcinos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los oviductos se obtuvieron a partir de genitales de cerdas cíclicas sacrificadas en matadero. Bajo condiciones estériles, se realizó la disección del oviducto separándolo de los tejidos adyacentes y del ovario. El semen utilizado procedió de diferentes verracos de fertilidad probada. Las muestras seminales se dividieron en 2: una de ellas se procesó a través de un gradiente discontinuo de Percoll® (Matas *et al.,* 2011) (grupo semen lavado en Percoll) y a la otra no se le realizó ningún tratamiento (grupo semen no lavado). Los oviductos se incubaron con una concentración aproximada de $1x10^5$ espermatozoides/ml de semen no lavado y lavado en gradientes de Percoll®. Tras una hora de co-cultivo (5% de CO_2 a 38,5ºC y con 95% de humedad), se fraccionó el oviducto en cuatro partes anatómicamente delimitadas, [unión útero-tubárica (UTJ), itsmo (I), unión ampular-ítsmica (AIJ) y ampolla (A)]. A su vez éstas se fijaron con medio *Bouin* durante 24 horas y se lavaron repetidamente en metanol al 75% durante 48 horas. Las muestras se deshidrataron a concentraciones crecientes de etanol y posteriormente embebidas en parafina para la realización de los bloques, los cuales se cortaron transversalmente con un grosor de 5 µm.

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 preparaciones histológicas con los espermatozoides unidos se incubaron con el anticuerpo primario antifosfotirosina (4G10, Millipore, Temecula, CA, EEUU) a una dilución 1:300 en PBS-BSA al 1% (p/v) durante 1 hora. A continuación se realizaron lavados con PBS 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 hora.

Las muestras se evaluaron con un microscopio de contraste de fases (Leica® DMR) bajo luz de fluorescencia (filtro I3 excitación azul BP 450-490; emisión LP 515) y campo claro.
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 usando un de test de comparaciones múltiples de proporciones Chi-cuadrado, ajustando la significación con el método de Bonferroni.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La diferente localización de las proteínas fosforiladas en la superficie espermática permitió describir varios patrones. Inicialmente se tomaron hasta 8 distribuciones diferentes de fosforilación, pero para simplificar el análisis se agruparon en 3: patrón I, (espermatozoides sin fosforilar, con o sin fosforilación en la región acrosomal o el flagelo), patrón II, (espermatozoides fosforilados en el subsegmento ecuatorial, sin fosforilar el área acrosomal y con o sin fosforilación en el flagelo), patrón III, (espermatozoides fosforilados en el subsegmento ecuatorial y el área acrosomal, con o sin fosforilación en el flagelo). En estudios de cinética de la capacitación se ha determinado que los espermatozoides sin ningún tratamiento no presentaban fosforilación o únicamente en el segmento ecuatorial, siendo la primera distribución encontrada durante la capacitación. A lo largo de la incubación en un medio capacitante, hay un aumento de la fosforilación de la región acrosomal y del flagelo, está última correlacionada con la adquisición de la hipermotilidad.
Los espermatozoides analizados en este trabajo fueron aquellos que estaban adheridos al epitelio oviductal. Los patrones de fosforilación encontrados difirieron entre las muestras espermáticas que habían sido lavadas de las que no lo fueron (Tabla 1). En términos generales, los espermatozoides sin lavar mostraron niveles menores de fosforilación en tirosina que los lavados a través de gradientes de Percoll® en todas las secciones del oviducto. El número de espermatozoides no lavados que presentó el patrón I disminuyó al ser incubados en el oviducto, en cambio no se vio afectado este parámetro para los espermatozoides lavados, excepto para aquellos encontrados en la UTJ donde se vio incrementado. Al analizar los resultados del patrón II observamos que ocurría todo lo contrario, es decir se producía un incremento en el número de espermatozoides con fosforilación en el subsegmento ecuatorial para el grupo de espermatozoides no lavado. Para los espermatozoides lavados sólo se produjo un ligero incremento en las zonas del istmo y la AIJ. Parece ser que aún siendo explantes de oviducto, el ambiente que encuentran los espermatozoides en él es suficiente para que se inicie el proceso de capacitación, puesto que se incrementa el nivel de fosforilación de las proteínas. En cambio, cuando los espermatozoides han sido lavados, este proceso ya se encuentra iniciado y solamente se produce una modulación del mismo en las diferentes regiones del oviducto (Georgiou et al., 2007). Finalmente, al observar los resultados del patrón III, vimos que el porcentaje de espermatozoides que lo presentaban era muy bajo, tanto para el caso de los espermatozoides no lavados y lavados aunque se produjo un incremento en la UTJ de este patrón en los espermatozoides no lavados. Sin embargo, para los espermatozoides lavados se produce un descenso respecto del control, además no se encontró en la UTJ ningún espermatozoide con este tipo de patrón. La adhesión entre los espermatozoides y las células oviductales esta mediada por moléculas expuestas en la superficie rostral de forma especie-específica (Green *et al.,* 2001). Al capacitarse, los espermatozoides podrían perder dichas moléculas, por lo que solo los espermatozoides sin fosforilar a nivel acrosomal serían capaces de unirse a las células oviductales, tal y como sucede en nuestros resultados. La interacción con las células oviductales modula el estado fosforilación en tirosina de las proteínas espermáticas, a la vez que representan un mecanismo de selección de la población espermática con niveles menores de fosforilación en tirosina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Georgiou, A.S., Snijders, A.P., Sostaric, E., Aflatoonian, R., Vazquez, J.L., Vazquez, J.M., Roca, J., Martinez, E.A., Wright, P.C. & Fazeli, A. 2007. J. Proteome Res. 6:4656-4666. • Green, C.E., Bredl, J., Holt, W.V., Watson, P.F. & Fazeli, A. 2001. Reproduction.122:305-315. • Hunter, R.H., Fléchon, B. & Fléchon, J.E. 1991. Tissue Cell. 23:641-656. • Matás, C., Coy, P., Romar, R., Marco, M., Gadea, J. & Ruiz, S. 2003. Reproduction. 125:133-141.• Matás, C., Vieira, L., García-Vázquez, F.A., Avilés-López, K., López-Úbeda, R., Carvajal,

J.A. & Gadea, J. 2011. Anim. Reprod. Sci.127:62-72. • Petrunkina, A., Friedrich, J., Drommer, W., Bicker, G., Waberski, D. & Töpfer-Petersen, E. 2001. Reproduction. 122:469-480.•Tardif, S., Dubé, C., Chevalier, S. & Bailey, J.L. 2001. Biol. Reprod. 65:784-792. • Töpfer-Petersen, E. Molecules on the sperm's route to fertilization. 1999. J. Exp. Zool. 285:259-266. • Visconti, P., Bailey, J., Moore, G., Pan, D., Olds-Clarke, P. & Kopf, G. 1995. Development. 121:1129-1137.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado por Fundación Séneca 08752/PI/08 y MICINN-FEDER (AGL 2009-12512-C02-01-02).

Tabla 1. *Distribución de la fosforilación en tirosina de las proteínas de espermatozoides unidos a las células oviductales.*

	Patrón I		Patrón II		Patrón III	
	No lavado	Lavados en Percoll	No lavado	Lavados en Percoll	No lavado	Lavados en Percoll
Control	77,50±0,02	5,01±0,01	21,00±0,02	81,20±0,02	1,50±0,01	13,7±0,02
UTJ	43,65±0,04[a]	27,50±0,04[a]	47,62±0,05[a]	72,50±0,04[b]	8,73±0,03	•
Istmo	38,25±0,02[a]	8,00±0,01[b]	58,25±0,03[a]	86,75±0,02[b]	3,50±0,01[a]	5,25±0,01[a]
AIJ	43,75±0,03[a]	5,75±0,01[b]	52,50±0,02[a]	83,75±0,02[b]	3,75±0,01[a]	10,50±0,02[a]
Ampolla	40,50±0,03[a]	10,50±0,02[b]	57,75±0,03[a]	81,00±0,02[b]	1,75±0,01[a]	8,50±0,01[b]

Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas (P<0,0001).
• Ningún espermatozoide fue encontrado en esa sección.

TYROSINE PHOSPHORYLATION ON PERCOLL-WASHED SPERM INCUBATED WITH PORCINE OVIDUCTAL EXPLANTS

ABSTRACT: The aim of this study was to characterize the different protein tyrosine phosphorylation distribution on Percoll-washed sperm attached to epithelial oviductal cell from porcine oviductal explants. Oviducts were collected from commercial cycling sows and semen from tested boars. Sperm were divided in two aliquot: one of them was centrifuged through a density gradient of Percoll and the other no, and incubated in the oviducts during 1 h. Later, oviduct was cut into four parts: ampulla, ampullary-ithsmic junction (AIJ), isthmus and utero-tubal junction (UTJ) and analyzed by indirect inmunofluoresce. Sperm without any treatment showed lower tyrosine phosphorylation levels than sperm washed through Percoll gradients in all sections of the oviduct. Un-washed spermatozoa increased levels of phosphorylation when were incubed in the oviduct. However, Percoll-washed sperm maintained similar levels of tyrosine phosphorylation. High levels of tyrosine phosphorylation were not found in sperm bound to epithelial cells, even in spermatozoa washed through Percoll gradients. Only spermatozoa with no-phosphorylated acrosome were able to attach to oviductal cells. Oviduct modulates tyrosine phosphorylation and selecting sperm population with low tyrosine phosphorylation levels.

Keywords: sperm tyrosine phosphorylation, capacitation, oviduct explants, pig.