BAJO CONDICIONES *IN VITRO*, LA ADHESIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES A LAS CÉLULAS DEL OVIDUCTO SE VE FACILITADA SI NO TIENEN EXTERIORIZADA LA FOSFATIDILSERINA

López-Úbeda R., Diego R. y Matás C.
Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus Mare Nostrum. 30100 Murcia. cmatas@um.es

INTRODUCCIÓN

In vivo, la adhesión de los espermatozoides a las células del oviducto juega un importante papel en la selección espermática y en la regulación de la capacitación, impidiendo que los espermatozoides de menor calidad alcancen los ovocitos (Holt y Fazeli, 2010). Estudios *in vitro* han demostrado que el co-cultivo de espermatozoides con células oviductales prolonga su viabilidad y motilidad, estabiliza el acrosoma (Kervancioglu et al., 1994; Morales et al., 1996) y mantiene su capacidad fecundante (Pollard et al., 1991). Además, los espermatozoides capacitados ven reducida su capacidad para unirse a las células epiteliales (Luño et al., 2013).

Diferentes eventos acompañan al proceso de capacitación espermática en mamíferos, entre los que destacan los cambios en la concentración intracelular de iones, la concentración de calcio libre intracelular, la fosforilación de residuos de tirosina o la modificación de la fluidez de la membrana plasmática, lo que lleva asociado un aumento en los niveles de translocación de fosfatidilserina (TPS) (de Lamirande et al, 1993; Visconti et al, 1995; Gadella y Harrison, 2002; Matas et al., 2011). La TPS tradicionalmente se ha considerado como un marcador de apoptosis (Casao et al., 2010), aunque actualmente existe cierta controversia a cerca de si esta modificación es consecuencia del proceso de capacitación (Barroso et al., 2000; Duru et al., 2001), de apoptosis (Aitken and Baker, 2013) o de ambos (Aitken, 2011).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar las posibles diferencias en los niveles de translocación de fosfatidilserina de la membrana espermática de espermatozoides porcinos después del co-cultivo con células epiteliales del oviducto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención y cultivo de células epiteliales de oviducto: los oviductos se obtuvieron a partir de aparatos reproductores de cerdas procedentes de matadero. Fueron transportados al laboratorio en un recipiente atemperado a 37ºC. En el laboratorio se lavaron en solución de cetramida (Cetab) y posteriormente en solución salina fisiológica atemperada. Sobre una placa de Petri, en condiciones estériles, se procedió a la disección del oviducto separándolo de los tejidos adyacentes, así como del ovario. La obtención de las células epiteliales del oviducto se realizó por compresión del mismo, desde la región del istmo hasta la ampolla. El contenido se recogió sobre una placa de Petri, las células se disgregaron con medio TCM-199 equilibrado. Tras varios lavados, las células se resuspendieron en medio TCM-199 fresco y se sembraron en placas de Petri a 38ºC con 5% CO_2 y atmósfera saturada. Transcurridos 3 días desde la siembra, se retiró el medio con las células no adheridas y se reemplazó por medio TCM-199 fresco. El proceso se repitió cada 2 días hasta la total confluencia de las células en una monocapa, aproximadamente a los 7 días. Con cada cambio de medio se comprobó la ausencia de contaminación y el crecimiento celular.

Procesado espermático: los espermatozoides fueron seleccionados a través de un gradiente discontinuo de Percoll® (Pharmacia, Uppsala, Sweden), mediante una columna de doble banda (45% Percoll® sobre 90% Percoll®) sobre la que se depositaron 0.5 ml de eyaculado. Las muestras se centrifugaron a temperatura ambiente a 700g durante 30 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en medio TALP previamente equilibrado, tras lo cual se centrifugó nuevamente a 700g durante 10 minutos y el pellet final que contenía los espermatozoides lavados (L) se resuspendió en medio TALP ajustando la concentración a $1x10^6$ células/ml.

Incubación de los espermatozoides lavados ($1x10^6$ spz/ml) sobre las células oviductales: se realizó en medio TALP durante 30 minutos a 38,5ºC, 5% de CO2 y atmosfera saturada de humedad. Transcurrido este tiempo las placas se lavaron bien y se recuperaron los espermatozoides. La incubación con células oviductales dio lugar a dos poblaciones

espermáticas: espermatozoides unidos a las células oviductales (U) y espermatozoides no unidos (NU). De forma paralela incubamos en placas sin células oviductales espermatozoides lavados (L30).
Evaluación de la translocación de fosfatidilserina en la membrana espermática: se llevó a cabo utilizando Annexin V-Cy3™ Apoptosis Detection Kit (Sigma, Madrid, Spain). Para ello, 1µL de Annexin V-Cy3™ (para determinación de la TPS), 5 µL de CFDA (para determinación de la viabilidad) y 450 µL de tampón fueron mezclados junto 50 µL de muestra espermática. Tras 10 minutos de incubación en oscuridad, las muestras se fijaron con formaldehído al 10%. Finalmente se evaluaron mediante un microscopio de epifluorescencia. Los espermatozoides con TPS presentaban fluorescencia roja (Ann+) y los espermatozoides viables fluorescencia verde (CFDA+).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos quedan reflejados en la tabla 1. Los niveles de TPS fueron significativamente diferentes para los grupos experimentales. Los espermatozoides lavados (L) mostraron un bajo nivel de translocación (28%), lo cual era de esperar, ya que mediante el procesado espermático se inicia el proceso de capacitación y con él, la desestabilización de la membrana y la translocación de PS (Vermes et al., 1995; Aitken y Krausz, 2002). Este nivel de translocación aumentó (43%) tras 30 minutos de incubación sin células oviductales como consecuencia del aumento de capacitación espermática (Luño et al., 2013). Los espermatozoides no unidos a las células oviductales (NU) presentaron una elevada translocación de fosfatidilserina (94.00%) mientras que los espermatozoides unidos (U) mostraron niveles de translocación significativamente menores que el resto de grupos, incluso menores que los de los espermatozoides lavados (L). Esto podría ser debido a que las células oviductales son capaces de seleccionar aquellos espermatozoides con menor TPS y, por ello, con un menor grado de capacitación ya que como observaron Luño et al (2013) los espermatozoides unidos al oviducto no presentaban fosforilación de la tirosina en la zona acrosomal (Luño et al., 2013). Esto podría explicar la diferencias observadas entre los espermatozoides unidos (U) y no unidos (NU) a las células. En todos los grupos experimentales los espermatozoides viables superaban el 44%, destacando el 94,78% que encontramos en los espermaotozides unidos (B):
Conclusión: bajo condiciones *in vitro*, los espermatozoides con bajo grado de TPS son los que, de forma mayoritaria, son seleccionados y unidos por las células oviductales

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Aitken RJ & Krausz C. 2002. Reproduction 122:497–506 • Aitken, 2011. Biol Reprod 85: 9-12 • Aitken and Baker, 2013. Int J Dev Biol 57:265-272 • Barroso et al., 2000. Hum Reprod 15: 1338-1344 • Casao et al., 2010. J Pineal Res 48:39-46 • Duru et al., 2001. Fertil Steril 75: 263-268 • Gadella & Harrison, 2002. Biol Reprod 67: 340-350 • Holt WV, & Fazeli A. 2010. Mol Reprod Dev. 77: 934-943 • Kervancioglu et al., 1994. Fertil Steril. 61, 1100–1108 • de Lamirande et al, 1993. Free Radic Biol Med 14:157-166 • Luño et al., 2013. Reproduction 146: 315-324 • Matas et al., 2011. Anim Reprod Sci 127: 62-72 • Morales et al., 1996. Hum Reprod. 11, 1504–1509 • Pollard et al., 1991. Biol reprod 44: 102-107 • Vermes et al., 1995. J Immunol Methods 184: 39–51 • Visconti et al, 1995. Development 121: 1129-1137.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado por MINECO (AGL2012-40180-C03-01).

***Tabla 1**. Resultados de Anexina V-CY3 obtenidos a partir de espermatozoides incubados en células oviductales: L (espermatozoides lavados, no incubados), L30 (espermatozoides lavados incubados 30 minutos en medio TALP sin células oviductales), NU (espermatozoides no unidos a las células oviductales tras 30 minutos de incubación), U (espermatozoides unidos a las células oviductales tras 30 minutos de incubación).*

TRATAMIENTO	N	ANEXINA POSITIVOS (Ann+)	VIABLES (CFDA+)
L	1000	28,00 ± 1,40 [a]	68,67 ± 4,73 [a]
L30	1200	43,00 ± 1,40 [b]	63,07 ± 4,65 [a]
NU	1600	94,00 ± 0,60 [c]	44,08 ± 4,76 [b]
U	1000	21,00 ± 1,30 [d]	94,78 ± 3,70 [c]

a,b,c,d: Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (P<0,05).
N: número de espermatozoides evaluados.

UNDER IN VITRO CONDITION, SPERMATOZOA WITHOUT EXTERNALIZATION OF PHOSPHATIDYLSERINE ARE MOST ABLE TO BIND OVIDUCTAL EPITHELIAL CELLS

ABSTRACT: Phosphatidylserine translocation is a feature of apoptosis and a marker commonly used to study this phenomenon (Casao et al., 2010). Therefore, differences in the levels of PS translocation between the population of sperm bound and not bound to the oviductal epithelial cells (OEC) could be expected. The aim of this study was to characterize possible differences in the phosphatidylserine translocation of boar sperm membrane after the co-culture with OEC. Sperm cells treated by discontinuous gradient of isotonic Percoll (washed sperm; L) were added to the oviductal epithelial cells (OEC) and incubated for 30 minutes. As control, washed sperm was incubated on Petri dish without OEC (L30). Four different sperm samples were analyzed by Annexin V-Cy3™ Apoptosis Detection Kit (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) to differentiate between sperm cells with (Ann+)/without (Ann−) inverted PS. Washed sperm (L) showed low levels of PS translocation (28.00%), these values increased (43.00%) after incubation in capacitation condition (TALP medium) without OEC (L30). Incubation with OEC resulted in two distinct groups: unbound sperm (NU) with high levels of PS inversion (94.00%) and bound sperm (U) that showed the lower levels (21.00%). These results showed that oviductal epithelial cells are able to select sperm cells without phosphatidylserine translocation and bind them.

Keywords*:* oviductal epithelial cells, sperm, phosphatidylserine translocation, porcine.