

5.- Discussió. Part I.

5.1.- Proteïnes de l'espermatozoide involucrades en la capacitació.

És un fet reconegut que els espermatozoides de mamífer, presents al testicle, no tenen capacitat fecundant⁷⁵. Al llarg del procés de maduració, i en el transit cap a l'epidídim, els espermatozoides adquireixen capacitat fecundant⁷⁶ però, no la tenen els espermatozoides de l'ejaculat, ja que es suprimeix quan els espermatozoides entren en contacte amb el plasma seminal. Això ens fa pensar que determinades molècules del plasma seminal, a l'unir-se a la membrana plasmàtica, juguin un paper funcional important.

L'alliberament de les proteïnes adherides a la membrana és un fet indispensable per a que l'espermatozoide tingui novament capacitat fecundant, i a la vegada permetre la sortida del colesterol, la fluidificació de la membrana i la interacció de receptors amb els seus lligands, tal com veiem a la figura 5 extreta del treball de revisió de Morros i Martínez³.

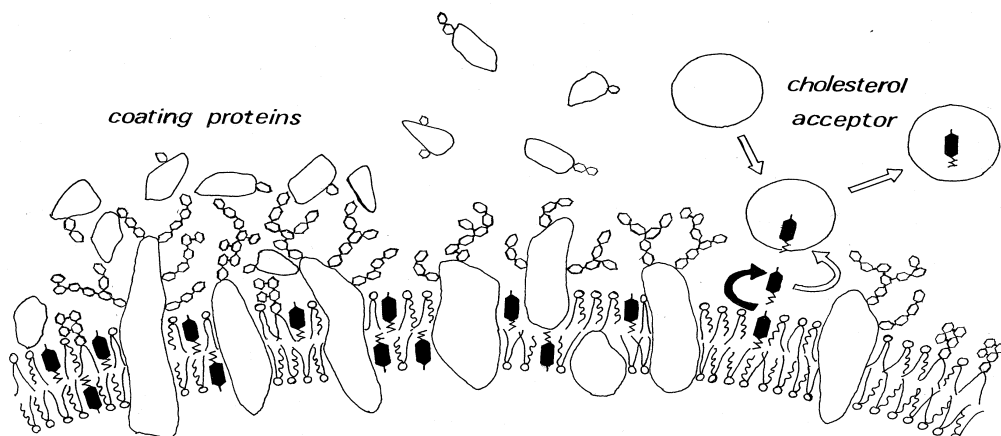


Figura 5. Representació gràfica de la membrana plasmàtica de l'espermatozoide humà. A la part de l'esquerra es representa la presència de les proteïnes d'adhesió (coating proteins) que, a mesura que es desprenen (centre), permeten la sortida del colesterol mitjançant la seva unió a acceptors del mateix (dreta).

La producció d'anticossos monoclonals específics de proteïnes del plasma seminal, que restin adherides a la membrana de l'espermatozoide després de l'ejaculat, ens permet la possibilitat d'estudiar com aquestes es van desprenent camí de l'úter, a les trompes de Fal·lopi, en el procés de capacitació in vivo o in vitro, i conèixer millor el seu paper funcional. Calvete⁷⁷, en

els darrers anys, ha purificat i caracteritzat una família de proteïnes del plasma seminal porcí, les espermadhesines, que actuen protegint la superfície de la membrana plasmàtica de l'espermatozoide, i eviten una reacció acrosòmica espontània prematura, lluny de l'oòcit. Per altre costat, les espermadhesines, tenen també una funció receptora com a primer lloc d'interacció amb els sucres de la zona pel·lúcida.

Les funcions de les proteïnes adherides a la membrana plasmàtica dels espermatozoides, de diferents espècies de mamífer descobertes, recolcen una de les hipòtesis que teniem en el nostre grup: que la incubació amb anticossos monoclonals podria inhibir la reacció acrosòmica induïda *in vitro*. La unió de l'anticòs monoclonal a la proteïna pot inhibir la seva dissociació al llarg de la capacitació. El nostre anticòs monoclonal SEM-12 reconeix un antígen que té aproximadament 80-84 kDa, la incubació dels espermatozoides humans amb l'anticòs monoclonal bloqueja per complet la reacció acrosòmica⁴². Els nostres resultats coincideixen amb els de Gupta⁷⁸ que observa com diferents anticossos monoclonals específics d'antígens del plasma seminal tenen un efecte inhibidor sobre la capacitat fecundant de l'espermatozoide.

Algunes proteïnes de membrana dels espermatozoides poden tenir un paper com a receptors, i sota uns estímuls concrets inicien una transducció de senyal cap a l'interior de la cèl·lula. Un exemple d'aquest tipus de funció l'hem observat, en el nostre grup, estudiant la presència de la Shc en l'espermatozoide humà⁷³. Els resultats d'aquest article mostren com l'espermatozoide capacitat en presència de progesterona provoca la fosforilació de proteïnes tirosina-quinases, entre elles la Shc52. Tal com altres autors han descrit^{79,80}, una porció dels receptors de la progesterona dels espermatozoides es presenta a la superfície, mentre que la resta no està present a la superfície fins al final de la capacitació. La capacitació afavoreix l'augment de receptors de progesterona exposats a la superfície de l'espermatozoide mitjançant la dissociació de les proteïnes adherides, i quan això succeeix, la unió de la progesterona provoca la reacció acrosòmica. Per tant, la presència de proteïnes del plasma seminal adherides a la membrana plasmàtica de l'espermatozoide actuen regulant l'activació de vies de transducció de senyal. La unió de l'anticòs monoclonal SEM-12 a la membrana actua bloquejant l'alliberament de l'antígen que reconeix en condicions de capacitació *in vitro*, la qual cosa implica, entre d'altres, la no externalització dels receptors de progesterona i per tant el bloqueig de la reacció acrosòmica.

En determinades ocasions però, un anticòs monoclonal pot presentar un efecte estimulador, enlloc d'inhibidor. Un resultat interessant en aquest sentit, és el que hem publicat utilitzant l'anticòs monoclonal CRL-10 específic d'un antígen present a l'acrosoma de l'espermatozoide humà. La incubació dels espermatozoides en presència de CRL-10 estimula la reacció acrosòmica⁷¹. La unió antígen-anticòs deu ser molt similar, en aquest cas concret, al de la proteïna receptora amb el seu lligand, donant lloc al mateix senyal que iniciï una transducció de senyal cap a l'interior de l'espermatozoide que provoqui la reacció acrosòmica.

In vitro, podem visualitzar la redistribució d'antígens al llarg de la capacitació, o bé l'aparició d'antígens una vegada s'ha perdut l'acrosoma i s'externalitza la membrana acrosomal interna, mitjançant la utilització dels anticossos monoclonals. Aquesta redistribució antigènica s'ha observat en moltes espècies de mamífer com ratolí⁸¹, rata⁸², humana^{83,84}. Amb l'anticòs monoclonal SEM-12⁴² hem observat la redistribució de l'antigen, de 80-84 kDa, al llarg de la capacitació i de la reacció acrosòmica. El patró de localització canvia de l'acrosoma a la zona equatorial (de vegades amb el postacrosoma marcat) quan té lloc la reacció acrosòmica. La redistribució antigènica en la membrana ve estretament lligada a l'augment de fluïdesa de membrana, moment en el que té lloc la redistribució de dominis lipídics i proteics, que preparen a l'espermatozoide per la reacció acrosòmica.

Les proteïnes adherides a la membrana tenen que ser dissociades per tal que l'espermatozoide adquireixi capacitat fecundant. Aquesta dissociació té lloc de manera gradual des del moment de l'ejaculació fins al moment en que l'espermatozoide interacciona amb l'oòcit. Calvete⁸⁵ ha quantificat les espermadhesines porcines en diferents fraccions purificades per HPLC tal com veiem a la Taula 5.

Taula 5. Contingut d'espermadhesines en els fluids provinents de les glàndules accessòries i en diferents estadis de la maduració expressats en µg/ml (1), Número de molècules d'espermadhesina/espermatozoide, expressat en funció de milions de molècules per cèl.lula.

	Fluid Seminal	Plasma Seminal	Esperma Epidídim	Esperma Ejaculat ⁽¹⁾	Esperma Swim-up ⁽¹⁾	Esperma capacitat 3 hores ⁽¹⁾	Esperma capacitat 24 hores ⁽¹⁾
AWN	2.1±0.2	1.8±0.2	6.7±0.8	50.4±24.2	37.6±11.4	9.5±1.5	7.3±1.2
AQN-1	1.2±0.1	1.1±0.2	----	21.9±10.5	16.4±4.8	9.3±1.1	7.1±1.3
AQN-2	7.2±0.5	6.4±0.7	----	61.5±29.3	45.9±13.4	20.3±8.2	15.4±2.8
AQN-3	0.6±0.1	0.5±0.1	----	12.5±6.2	9.4±2.8	9.7±3.6	7.4±2.4

Amb anticossos monoclonals específics de molècules solubles, adherides a la membrana de l'espermatozoide, podem realitzar un estudi de la cinètica de pèrdua de les mateixes al llarg de la capacitació per diferents tècniques (Western Blot, Immunofluorescència, Citometria, ELISA). La Dra Gizela Gnessova, del grup de la Dra. Jana Pècknicova de Praga, va realitzar una estada al nostre centre per tal de caracteritzar els antígens reconeguts per una col.lecció d'anticossos monoclonals produïts al seu centre. Un d'aquests anticossos monoclonals, el clon H25, reconeix una proteïna present al plasma seminal. La Figura 6 mostra com el marcatge a la cèl.lula es perd al llarg de la capacitació, i com consegüentment trobem l'antigen en forma soluble al sobrenedant, i quina relació té aquest fenomen amb la reacció acrosòmica.

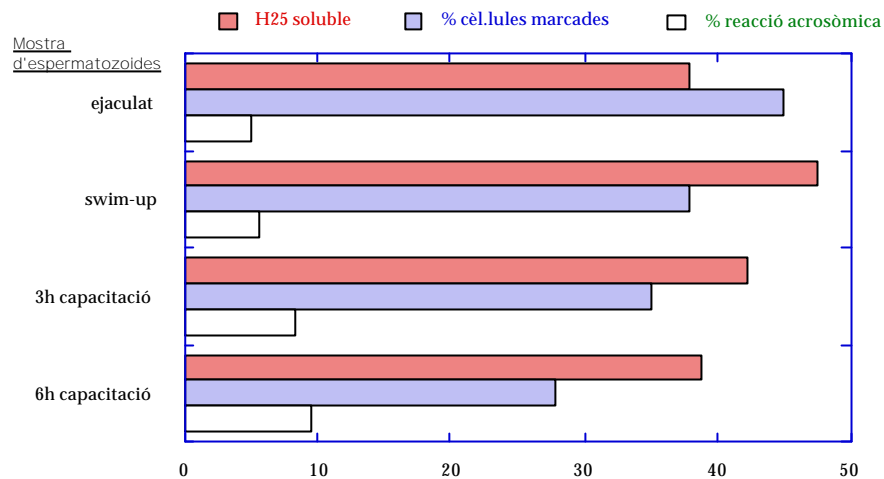


Figura 6: Relació entre la pèrdua de marcatge, amb l'anticòs monoclonal H25, a la superfície de l'espermatozoide i l'increment de cèl.lules amb la reacció acrosòmica completa.

Per tal d'estudiar si la dissociació de les proteïnes adherides a la membrana de l'espermatozoide, es dona de manera similar in vivo, i per conèixer la localització exacta on s'alliberen les proteïnes adherides vàrem produir anticossos monoclonals contra la espermadhesina de porc AWN-1, en col.laboració amb el Dr. Calvete. Tal com es mostra en els treballs de Calvete⁷² i Rodríguez-Martínez⁷⁴ els anticossos produïts en el nostre grup, de l'Institut de Biologia Fonamental, han servit per estudiar la dissociació de les proteïnes del plasma seminal porcí adherides a la membrana de l'espermatozoide en el moment de l'ejaculat, i a més, hem observat com s'adsorbeixen en el tracte genital femení una vegada es troben en forma soluble al tracte genital femení. Aquests estudis, realitzats amb porcs als que se'ls practica la inseminació artificial, mostren com l'AWN-1 s'allibera entre el lloc de deposició dels espermatozoides, l'úter, i la zona d'unió entre l'úter i les trompes de Falopi, la zona d'unions utero-tubals (UTJ). Això implica que els espermatozoides que arriben a la rodalia de l'oòcit estan precapacitats, han perdut gran part de l'envolcall d'espermadhesines i, per tant, són capaços d'interaccionar i reaccionar el seu acrosoma. Aquestes dades reforcen la idea que la dissociació d'aquest tipus de proteïnes de la membrana de l'espermatozoide és indispensable per a la fecundació de l'oòcit.

5.2.- Paper de la sortida del colesterol en la capacitació de l'espermatozoide.

Fins ara hem vist el paper d'aquest tipus de proteïnes del plasma seminal presents a la membrana de l'espermatozoide però, quin paper juguen els lípids en el procés de la

capacitació? Per un costat, cal ressaltar el paper inhibitori del plasma seminal en la capacitació. L'addició de plasma seminal, autòleg o heteròleg, en una mostra d'espermatozoides incubada en condicions capacitants in vitro pot revertir el procés de la capacitació tal com ha descrit Cross²¹. Què hi ha al plasma seminal que afavoreixi aquesta inhibició?

Les proteïnes del plasma seminal adherides a la membrana de l'espermatozoide, poden bloquejar receptors, disminuir la fusogenicitat de la membrana, estabilitzant novament la membrana plasmàtica de l'espermatozoide. S'han descrit diferents estructures lipídiques del plasma seminal que poden tenir un paper regulador, entre altres s'han proposat vesícules lipídiques^{86,87,88}, glicòsids⁸⁹, l'espermina⁹⁰ i el colesterol²¹. El colesterol present al plasma seminal, està capturat per lipoproteïnes acceptores de colesterol, donada la seva insolubilitat. El fet d'incubar espermatozoides capacitats, que han perdut colesterol de la seva membrana, en presència de plasma seminal, pot resultar en la incorporació d'aquest colesterol del plasma seminal a la membrana, que rigidifica la membrana. Molts dels treballs publicats proposen que les proteïnes adherides, o bé el colesterol, són els responsables de la inhibició de la capacitació i reacció acrosòmica.

La sortida de colesterol de la membrana de l'espermatozoide regula la fluïdesa de la seva membrana^{50,91} i aquest fenomen modula la mobilitat de fosfolípids i de proteïnes, fet que ens ajuda a explicar la seva redistribució al llarg de la capacitació^{81,82,83,84}. Hem provat diferents acceptors de colesterol per estudiar la seva sortida al llarg de la capacitació: a) l'albumina, perquè com altres lipoproteïnes està present al fluid uterí i líquid fol·licular, i perquè és l'acceptor universal utilitzat en medis de capacitació in vitro^{92,93} i b) la β -ciclodextrina perquè s'havia descrit la seva capacitat d'alterar la composició lipídica en eritròcits. Ohtani⁹⁴ observa que aquest fenomen es deu a la captura del colesterol de membrana.

La quantitat de colesterol que aconseguim extreure de la membrana amb l'albumina és molt contradictòria, tot i ser utilitzada normalment en medis de capacitació in vitro^{95,96}. Utilitzant l'albumina com acceptora de colesterol, autors com Go⁹⁵, Langlais⁹⁷ o Davis⁹⁸ obtenen una sortida de colesterol significativa, mentre que altres autors, com el mateix Davis⁹⁶ o Sugrakoek⁹⁹ en altres treballs no observen una sortida significativa de colesterol. Nosaltres, amb les tècniques utilitzades, no hem observat una sortida de colesterol significativa utilitzant l'albumina com a acceptora. Els nostres resultats són similars als descrits per Sugrakoek⁹⁹ on veu menys d'un 5% de sortida de colesterol, respecte a altres autors com Benoff¹⁰⁰ o Langlais⁹⁷ que descriuen un 15 i 26% de sortida respectivament. És possible que, in vitro, una petita sortida de colesterol prepari als espermatozoides i els faci susceptibles a l'estímul dels inductors de reacció acrosòmica. Un altre fet que pot explicar que no aconseguim observar la sortida del colesterol, és la puresa de l'albumina comercial emprada com acceptora. Petites contaminacions (colesterol i altres lípids) en albúmines comercials poden bloquejar la funció acceptora de l'albumina.

Utilitzant la β -ciclodextrina com acceptora hem obtingut resultats espectaculars publicats en un dels articles presentats en aquesta Tesi⁷⁰, que impliquen una sortida molt ràpida d'una gran quantitat de colesterol, seguit d'una segona sortida més lenta. Als 30 minuts d'incubació ha sortit pràcticament el 50-60% del colesterol total, això es tradueix en una reacció acrosòmica a partir dels 60 minuts posteriors, reacció acrosòmica, que per altre banda, és completament fisiològica ja que es manté la vitalitat. Aquest retard entre la sortida del colesterol i la reacció acrosòmica implica que la sortida massiva de colesterol no desestructura la membrana, sinò al contrari, permet la transducció de senyal cap a l'interior de l'espermatozoide, com descriu Visconti¹⁰¹.

Cal estudiar amb més detall com és la sortida del colesterol amb acceptors com l'albúmina. Hem estat un dels grups pioners en observar i demostrar el paper de la β -ciclodextrina com acceptora de colesterol en l'espermatozoide, i a més els primers en atribuir a la β -ciclodextrina una funció inductora de la reacció acrosòmica en l'espermatozoide de boc. Altres autors com Cross¹⁰² i Osheroff¹⁰³ han observat l'efecte de la β -ciclodextrina en l'espermatozoide humà. Els experiments que hem realitzat amb espermatozoides de boc per a estudiar l'efecte de la β -ciclodextrina, els hem realitzat de manera paral·lela amb espermatozoides humans. Nosaltres, contràriament a l'observat per Cross¹⁰², hem observat un efecte tòxic de la β -ciclodextrina en la mostra humana. La toxicitat l'atribuïm a la diferent composició lipídica de les membranes dels espermatozoides de boc i humà, o al diferent tamany dels acrosomes que implicaria una major fragilitat de l'acrosoma humà, més reduït, a canvis tant sobtats com el potent eflux induït per la β -ciclodextrina. A la Figura 7 mostrem la comparació de l'efecte de la concentració de β -ciclodextrina, utilitzada en espermatozoide de boc, sobre els espermatozoides humans (8mM) i la concentració màxima que no produïa efectes letals en els espermatozoides humans (1mM), on s'aprecia que no existeix cap efecte significatiu en els mateixos respecte als resultats obtinguts per Cross que parla d'un efecte positiu de la β -ciclodextrina (1mM) sobre la reacció acrosòmica fisiològica de l'espermatozoide humà¹⁰². Parlem de reacció acrosòmica fisiològica en aquelles cèl·lules que han reaccionat sense que la seva vitalitat es vegi afectada. Com es pot observar a la Figura 7, amb 1mM β -ciclodextrina s'aprecia l'augment de la reacció acrosòmica total (cèl·lules viues i mortes) però no de la fisiològica, per la qual cosa atribuïm aquest efecte tòxic de la β -ciclodextrina sobre l'espermatozoide humà. L'únic que observem, en l'espermatozoide humà, és un augment de la reacció acrosòmica total (espermatozoides reaccionats vius i morts), però aquest resultat pot ser degut a la degeneració de la membrana dels espermatozoides morts a conseqüència dels efectes tòxics de la β -ciclodextrina.

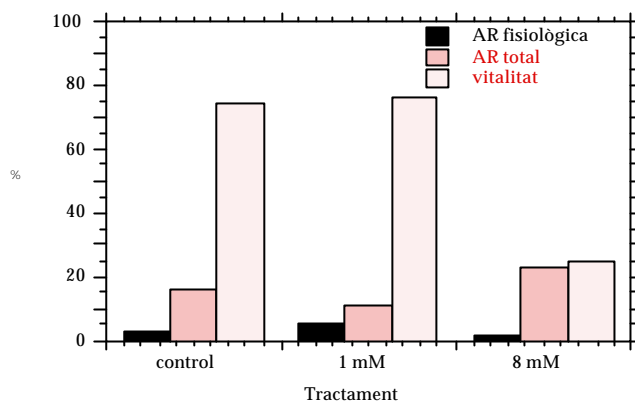


Figura 7: Efecte negatiu de 8mM β -ciclodextrina sobre la vitalitat dels espermatozoides humans i la reacció acrosòmica fisiològica (cèl.lules vives reaccionades), en comparació als efectes observats incubant amb 1mM β -ciclodextrina.

Un treball que ens hauria agradat realitzar, seria comprovar realment si aquesta sortida tant dràstica de colesterol, que no altera la vitalitat, té conseqüències negatives en la funcionalitat de l'espermatozoide alhora de fecundar l'oòcit. Visconti¹⁰¹ ha publicat un estudi on realitzen fecundacions in vitro amb espermatozoides de ratolí preincubats amb ciclodextrina. Aquest estudi ha permès observar un efecte positiu en la sortida del colesterol per augmentar la taxa de fecundació. Segons Visconti¹⁰¹, la sortida del colesterol dóna lloc a l'activació de senyals que generen una transducció de senyal cap a l'interior cel.lular, que involucraria al cAMP via tirosina quinases, definint un nou model de transducció de senyal cel.lular induït per l'alliberament del colesterol. Choi¹⁰⁴ també ha estudiat el paper de la ciclodextrina en la capacitat dels espermatozoides prèviament a la seva utilització en fecundació in vitro. Tots aquests treballs publicats en els darrers 2 anys recolzen la utilització de la β -ciclodextrina per a la fabricació d'un medi de capacitat sintètic que no requereixi d'un aport proteic extern (albúmina).

Una de les hipòtesis que ens hem plantejat per explicar la diferent capacitat d'acceptió de colesterol per part de l'albúmina i la β -ciclodextrina és el seu tamany molecular (65000 i 1400 daltons respectivament), idea que concorda amb una de les conclusions del treball de Rothblat¹⁰⁵. Tal com mostra el model que proposem⁷⁰, a la Figura 8, els espermatozoides ejaculats, separats del plasma seminal per centrifugació, no perden totes les proteïnes del plasma seminal, moltes d'elles resten adherides a la membrana on formen un envolcall glicoproteic. En aquests espermatozoides, incubats en presència d'acceptors, hauriem de poder observar un augment de la seva fluidesa de membrana. Un acceptor petit, com la ciclodextrina, pot endinsar-se en l'entramat format per totes les cadenes glucídiques fins arribar a la membrana i capturar el colesterol. Acceptors més grans, com l'albúmina, no

podrien travessar l'envolcall i tindrien dificultats per l'acceptió del colesterol si prèviament no existeix una dissociació de les proteïnes adherides a la membrana.

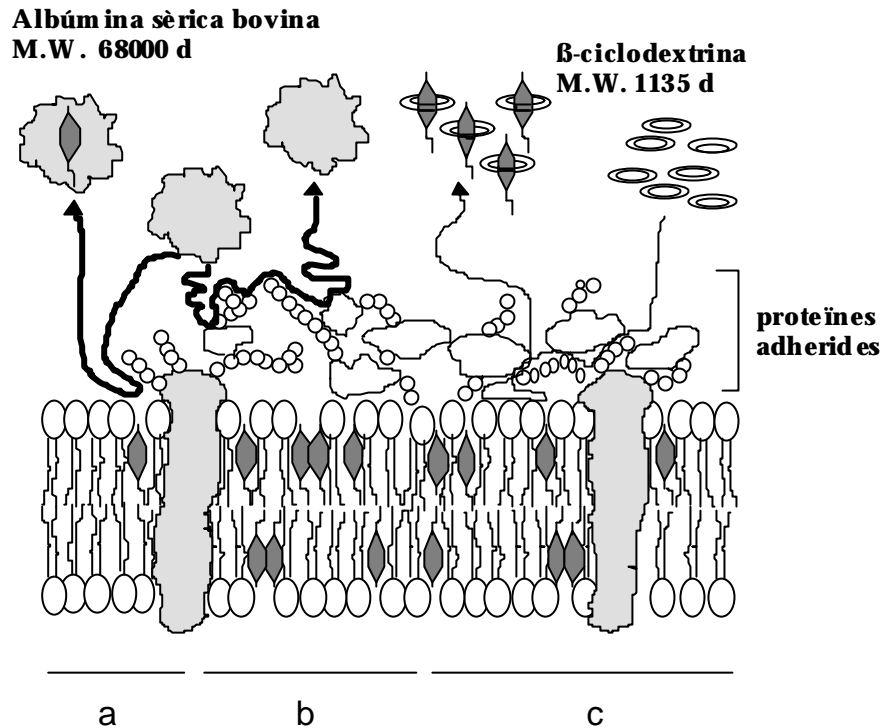


Figura 8. (a) Molècules de elevat pes molecular tans sols poden acceptar colesterol quan tenen una accesibilitat directa a la superfície de la membrana plasmàtica, després de la dissociació de les proteïnes del plasma seminal adherides a la mateixa. (b) A l'espermatozoide ejaculat, o bé si les proteïnes del plasma seminal no es dissocien correctament al llarg de la capacitació, aquesta sortida del colesterol no seria efectiva. (c) Molècules acceptores de tamany molecular petit, com la β-ciclodextrina, poden travessar l'envolcall de proteïnes adherides a la membrana plasmàtica, amb el que la sortida del colesterol es donaria eficientment sense que la dissociació de les proteïnes del plasma seminal adherides reguli la sortida del colesterol.

Segurament, la ràpida acceptió del colesterol per la β-ciclodextrina deu donar lloc a un augment significatiu de la fluïdesa de membrana, mesurada com pèrdua de colesterol, que donarà lloc a la dissociació de les proteïnes adherides i a la reacció acrosòmica. Langlais⁹⁷ descriu com la t_{1/2} (temps mig de sortida del colesterol) per la sortida del colesterol en presència de líquid fol·licular és superior a una hora mentres que la que trobem per la ciclodextrina és una t_{1/2} de 10 minuts. El que de manera fisiològica deu passar però, deu semblar-se més al que observem quan utilitzem l'albúmina com acceptora, una sortida de colesterol paulatina i lenta que contribueix a un lleuger augment de la fusogenicitat de

l'espermatozoide acompanyat de la dissociació d'algunes molècules adherides a la membrana que faciliten aquest lent augment de la fluidesa de la membrana, amb una sortida més ràpida en el moment que l'espermatozoide emet un senyal cap a l'interior cel·lular resultat de la màxima dissociació de les proteïnes adherides a la membrana i a la interacció amb la zona pel·lúcida de l'oòcit. Evidentment, les proteïnes adherides, a la membrana de l'espermatozoide, juguen un important paper, que la seva dissociació sigui més o menys eficient contribueix a afavorir aquest augment de la fusogenicitat de l'espermatozoide.

Una vegada l'ejaculat es diposita a la vagina, els espermatozoides que nedan cap a l'úter van perdent les proteïnes adherides a membrana, tal com es descriu en els treballs de Calvete amb les espermadhesines^{72,77}. Els espermatozoides que arriben a les trompes de Fal·lopi han perdut gran quantitat de les mateixes. És en aquest moment quan té lloc la sortida de colesterol, sota la influència dels fluids biològics presents a les trompes. Una mínima sortida de colesterol deu ser suficient per augmentar la fluidesa de la membrana, per l'intercanvi flip-flop de fosfolípids de la cara interna a l'externa, per la mobilització/migració de proteïnes i també de lípids, que s'organitzen en forma de dominis rígids i fluids per afavorir una major capacitat fusogènica a l'acrosoma¹⁰¹. El resultat final serà que l'espermatozoide rebrà el senyal provinent de la interacció amb els sucres de la zona pel·lúcida de l'oòcit¹⁰⁶ i tindrà lloc la reacció acrosòmica.