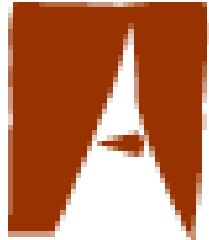


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE VETERINARIA**



**Universitat
Autònoma
de Barcelona**

**Estudio del metabolismo energético de los
espermatozoides porcinos y su repercusión
en el diseño de diluyentes optimizados para
la conservación de semen refrigerado**

Tesis Doctoral presentada como compendio
de publicaciones por Antonio Arvelo Medrano Díaz

Bellaterra, Junio de 2005

Joan Enric Rodríguez Gil. Profesor Titular del Departamento de Medicina y Cirugía Animales de la facultad de veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Certifica:

Que la tesis titulada **“Estudio del metabolismo energético de espermatozoides porcinos y su repercusión en el diseño de diluyentes optimizados para conservación de semen en refrigeración.”** Presentada por **Antonio Medrano Diaz** para optar al grado de Doctor en Veterinaria, ha sido realizada bajo su dirección y, considerándola acabada, autoriza su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que conste a los efectos que corresponda, firmo la presente en Bellaterra el 15 de Abril de 2005.

Joan Enric Rodríguez Gil

ÍNDICE

RESUMEN	4
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	8
1. Introducción.....	8
2. Objetivos.....	16
2.1 Objetivo general.....	16
3. Referencias Bibliograficas.....	18
CAPÍTULO II. Revisión Bibliográfica	22
Referencias Bibliograficas.....	29
CAPÍTULO III. Hexokinase and Pyruvate Kinase steps regulate the specific utilization of monosaccharides in boar spermatozoa from fresh ejaculates	34
Abstract.....	35
1. Introduction.....	36
2. Materials y methods.....	39
3. Results.....	46
4. Discussion.....	72
5. Acknowledgments.....	78
6. References.....	78
CAPÍTULO III: Texto en español. La utilización específica de los monosacáridos a través de la glucólisis es regulada por medio de la modulación de las actividades hexoquinasa y piruvato quinasa en espermatozoides de cerdo provenientes de ejaculados frescos	84
Resumen.....	85

1. Introducción.....	86
2. Materiales y método.....	90
3. Resultados.....	97
4. Discusión.....	120
5. Agradecimientos.....	127
6. Referencias Bibliograficas.....	127
CAPÍTULO IV. Utilization of citrate and lactate through a lactate dehydrogenase and ATP-regulated pathway in boar spermatozoa.....	133
Abstract.....	134
1. Introduction.....	135
2. Materials y methods.....	136
3. Results.....	142
4. Discussion.....	161
5. References.....	165
CAPÍTULO IV: Texto en español. Utilización de citrato y de lactato por una vía regulada por la actividad lactato deshidrogenasa y los niveles de ATP en espermatozoides de cerdo.....	169
Resumen.....	170
1. Introducción.....	170
2. Materiales y método.....	172
3. Resultados.....	178
4. Discusión.....	196
5. Agradecimientos.....	202
6. Referencias bibliograficas.....	202

CAPÍTULO V. Variations in the proportion of glycolytic/non-glycolytic

energy substrates modulate sperm quality in diluted boar samples stored at 15°C-17°C.....	206
Summary.....	207
1. Introduction.....	207
2. Materials y methods.....	210
3. Results.....	213
4. Discussion.....	219
5. Acknowledgements.....	221
6. Referentes.....	221
CAPÍTULO V: Texto en español: Las variaciones en la proporción de sustratos energéticos glucolíticos / no glucolíticos modulan la calidad espermática en muestras de cerdo almacenadas a 15°C-17°C.....	223
Resumen.....	224
1. Introducción.....	224
2. Material y método.....	228
3. Resultados.....	231
4. Discusión.....	238
5. Agradecimientos.....	240
6. Referencias.....	240
CAPÍTULO VI. Discusión General.....	242
Referencias Bibliograficas.....	247
CAPÍTULO VII. Conclusiones.....	250

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi familia, a mi tía y a mis hermanos que nunca perdieron su fe en mí.

Por otro lado agradecer a mi tutor el Dr. Joan Enric Rodríguez- Gil, sin cuyo apoyo no podría haber finalizado con éxito esta empresa.

A la Dra. Teresa Rigau, ya que gracias a la oportunidad que me dio de incorporarme al proyecto de cooperación con la empresa “Calier” pude concluir mis estudios de Doctorado.

Al Dr. Jordi Miró por que además de formar un estupendo equipo de trabajo es un buen amigo.

A la Dra. Teresa Mogas y la Dra. Maria Jesús Palomo por su solidaridad.

A todos los compañeros Venezolanos, Atilio, Xomaira, William, Denice, Aixa, José Antonio, Wilfrido, Armando, Westalia, Ana Graciela, Gustavo, Gabriela, Jorge y Gilda.

A todos los que han pasado por esta unidad, Joan, Merixell, Nuria, José Luis, Claudia, Erika, Montse, Laura, Roser, Ester, Agustina, Ana, Macarena, Xavier, Sergio, Alfredo, Christel y Dalia.

Agradezco también a otras personas como la Sra. Eulalia, al Sr. Antonio por aceptarme como parte del grupo.

A la familia Martín Madrigal por su sincera amistad y por todas sus ayudas “informáticas”.

Y finalmente a mi amigo, “confesor” y técnico de laboratorio “todo terreno” Alex Peña.

¡A TODOS MUCHAS GRACIAS!

RESUMEN

Medrano Díaz, Antonio A. 2005. Diseño de diluyentes optimizados para la conservación de semen porcino en refrigeración.

El primer objetivo de este estudio fue determinar los mecanismos de utilización energética de diferentes monosacáridos (glucosa, fructosa, manosa y sorbitol), por parte de los espermatozoides de cerdo. Para ello, los espermatozoides fueron incubados sin ningún sustrato energético y con diferentes hexosas. Las concentraciones utilizadas de las hexosas fueron de 10 mM, siempre que se quería determinar el efecto del tiempo de incubación, y de 1mM, 5mM, 10mM, 20 mM, 50mM cuando lo que se pretendía determinar era el efecto de la concentración del sustrato metabolizable. Las incubaciones se realizaron durante 5 min., 15 min., 30 min., y 60 min., para el caso del efecto tiempo, y durante 60 minutos para analizar el efecto concentración. Las incubaciones fueron realizadas en un medio de Krebs-Ringer-Henseleit carente de sustratos energéticos. Tras estas incubaciones, se determinaron tanto la viabilidad como el estado de los acrosomas como marcadores funcionales del estado de los espermatozoides. También se determinaron los niveles intracelulares de algunos metabolitos energéticos, como la glucosa 6-fosfato, el glucógeno y el trifosfato de adenosina (ATP). Además, también se midió el ritmo de formación de L-lactato extracelular proveniente de la glucólisis y el de CO₂ como producto final del ciclo de Krebs. La conclusión más relevante extraída de este estudio fue que la glucosa es el monosacárido utilizado preferentemente por los espermatozoides de cerdo. Esta glucosa es metabolizada principalmente por la vía glucolítica (en un 99%). Finalmente, el control de la vía de consumo de la glucosa se realiza básicamente en dos puntos, el

primero la modulación de la actividad hexoquinasa, y el segundo la modulación de la actividad piruvato quinasa.

Como complementación del estudio anterior, también se estudió el comportamiento cinético de las principales actividades enzimáticas que controlan la ruta glucolítica, como son la hexoquinasa, que regula la fosforilación inicial de los monosacáridos, y la piruvato quinasa, que regula la introducción del producto final de la glucólisis en el ciclo de Krebs. Estos estudios mostraron que la hexoquinasa tiene una afinidad muy superior hacia la glucosa cuando la comparamos con los otros monosacáridos estudiados, mientras que la piruvato quinasa muestra una gran dependencia en su actividad del equilibrio intracelular entre los niveles de bifosfato de adenosina (ADP) y de ATP, lo que permite un control muy sensible de la obtención de energía a través del flujo glucolítico. Finalmente, también se evaluó el patrón de fosforilación en residuos de tirosina en los espermatozoides de cerdo. Los extractos celulares mostraron un patrón uniforme, con una banda de fosforilación mayoritaria a 45 Kda de peso. Este patrón no sufrió cambios significativos tras la incubación con cualquiera de los azúcares. Este resultado indica la falta de una acción moduladora específica de los azúcares sobre la funcionalidad espermática porcina.

Otro de los objetivos consistió en evaluar la utilización de sustratos no glucolisables, y por lo tanto, no utilizables a través de la glucólisis, para la obtención de energía como el citrato y el lactato por parte de los espermatozoides de cerdo. El diseño experimental sobre concentraciones y tiempos de incubación fue igual al ya descrito para los monosacáridos. Las incubaciones también se realizaron en un medio de Krebs-Ringer-Henseleit carente de azúcares, y los parámetros evaluados fueron los mismos que en la primera fase de este trabajo. Además, en este caso se determinó el comportamiento cinético de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) como punto clave de control de la

entrada de sustratos hacia el ciclo de Krebs. Este estudio estableció la presencia de un tipo de LDH específico de esperma en el espermatozoide de cerdo, lo que fue evidenciado a través del análisis del Western blot y confirmado por los resultados de inmunocitoquímica, los cuales mostraron una reacción positiva en la pieza principal de la cola, con una débil señal en la pieza intermedia.

La conclusión principal que se pudo deducir de los resultados obtenidos con los sustratos no glucolisables fue que los espermatozoides de cerdo pueden utilizar eficientemente como única fuente de energía tanto el citrato como el lactato, la utilización de estos sustratos se lleva a cabo a través de vías energéticas controladas por la LDH, es decir, básicamente el ciclo de Krebs, siendo el ritmo de flujo asimismo estrechamente regulado por los niveles intracelulares de ATP.

También se evaluó en este caso el efecto de la incubación con citrato o lactato sobre el patrón de fosforilación en residuos de tirosina. En este caso, al incubar con 10 mM de citrato o lactato se observó un aumento notable de la intensidad de todas las bandas, especialmente de la de 45Kda, si bien no aparecían cambios significativos en el patrón de bandas específico de fosforilación, este resultado indica igualmente una falta de acción específica de los sustratos sobre la funcionalidad espermática.

El objetivo final de nuestro trabajo fue el diseño de cuatro fórmulas experimentales, que combinaran un monosacárido a diferentes concentraciones con un sustrato no glucolisable (citrato o lactato a diferentes concentraciones), con el objetivo primordial de estudiar el efecto que tiene estos cambios en el tipo específico de suministro energético en la conservación a largo plazo en refrigeración. La finalidad subyacente a este estudio fue la de obtener información para la obtención de un diluyente de conservación de semen refrigerado porcino que lograra sobrepasar los 7 días de conservación entre 15 y 17°C. Para evaluar la eficacia de estas cuatro formulas en la

conservación de semen refrigerado de cerdo se midieron los siguientes parámetros: Los porcentajes de viabilidad y de acrosomas alterados, como indicadores del estado funcional del espermatozoide, el ritmo de formación de lactato, los Tests de Resistencia Osmótica (ORT) y de Resistencia Hiperosmótica (HRT), como las pruebas de mayor significación para evaluar la calidad de los espermatozoides, tal y como ha sido descrito en publicaciones previas. La conclusión final fue que un medio que contenga niveles altos de glucosa (siempre inferiores a los que contienen los diluyentes comerciales más ampliamente utilizados) y niveles relativamente bajos de lactato como fuente alternativa de energía permite una conservación de los espermatozoides porcinos a temperaturas entre 15-17°C por un tiempo mayor a lo observado incluso en diluyentes comerciales utilizados ampliamente, como el BTS. Por lo tanto, un diseño optimizado de las fuentes energéticas glucolíticas y no glucolíticas es imprescindible para la mejora de los diluyentes de semen porcino en refrigeración.

Claves: Metabolismo espermático, Monosacáridos, piruvato, lactato, sustratos energéticos, conservación en refrigeración.

CAPÍTULO I:

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN

En la industria del cerdo, la inseminación artificial (IA) con semen refrigerado se ha venido utilizando con bastante éxito en esta especie desde hace unos 20 años en la mayoría de países desarrollados. De hecho, el 99% de las dosis que se comercializan para la IA en cerdos son de semen refrigerado (Jonson et al., 2000), obteniéndose resultados de un 83% de partos con una prolificidad media de 10-11 lechones por camada (Johnson LA., 1998). En cambio, la utilización de semen congelado es inferior al 1% de todas las inseminaciones realizadas en esta industria (Jonson et al., 2000). Esta gran diferencia de utilización se basa tanto en aspectos técnicos como comerciales. Así, si bien es cierto que tanto la refrigeración como la congelación inducen cambios en la funcionalidad espermática parecidos a la capacitación en numerosas especies domésticas (Bailey et al., 2000), el proceso de criopreservación produce una mucho mayor disminución de la fertilidad al compararlo con la refrigeración, probablemente a causa de la combinación de la ya mencionada alteración de la funcionalidad con una pérdida de viabilidad de los espermatozoides debida a las grandes alteraciones ultraestructurales que ha de soportar la célula durante el proceso de congelación/descongelación. Para entender mejor el daño extra producido por la congelación, hay que explicar que, como punto más importante, el cambio brusco de temperatura implícito en el proceso provoca un considerable estrés osmótico y tóxico por exposición de las células a una elevadísima concentración molar de los crioprotectores, además de inducir la formación y posterior disolución de hielo en el ambiente extracelular (Watson PF., 2000). Por otra parte, el coste económico de la congelación es muy superior al de la refrigeración, por lo que el gasto en la realización

de una IA con semen congelado también es muy superior a la de la misma IA con semen refrigerado. La combinación de ambos factores explicaría la poca incidencia que tiene hoy en día el uso de semen congelado en el manejo rutinario de las granjas porcinas.

La gran extensión de la IA en las explotaciones porcinas ha llevado a la puesta en el mercado de un gran número de diluyentes diseñados para su uso de forma rutinaria en la dilución y conservación de semen refrigerado a 15-18° C (Althouse GC., 1997; Althouse et al., 1998; Dubé et al., 2004). Todos estos diluyentes están diseñados para lograr mantener la capacidad fertilizante de los espermatozoides durante varios días, (Dubé et al., 2004), siendo una de las cuestiones más importantes que tiene que solventar el hecho de permitir a los espermatozoides conservados una óptima utilización de las fuentes energéticas presentes en su composición. Teniendo en cuenta esto, los diluyentes de semen de cerdo en refrigeración han sido subdivididos en dos grupos, basados en la longitud de tiempo que son capaces de preservar el semen en estado líquido sin apreciable pérdida de su fertilidad. Estos grupos reciben el nombre de diluyentes de corta duración (cuando conservan el semen por 1-2 días) y diluyentes de larga duración (cuando conservan el semen por más de 3 días). En estos últimos, además de conservarse durante mayor periodo de tiempo, se encuentran nutrientes para la obtención de energía y la protección a largo plazo de la célula frente al choque por frío, y además, mediante una solución tamponada, son capaces de controlar los efectos dañinos de las fluctuaciones del pH, así como el mantenimiento de un apropiado balance osmótico (Althouse FC., 1997). Por lo tanto, el control de todos estos aspectos es fundamental para la optimización del diseño de estos diluyentes.

En la actualidad, uno de los principales objetivos en espermatología es el desarrollo de nuevos métodos que permitan detectar con precisión las alteraciones características en

los espermatozoides, y que también sean capaces de predecir o evidenciar una reducción en la fertilidad (Amman y Hammerstedt., 2002; Gadea J., 2005). Los métodos clásicos para la evaluación de semen se basan en la aplicación conjunta de una batería de pruebas para garantizar el control de calidad de las dosis seminales que se comercializaran posteriormente. La evaluación de la motilidad es la prueba más utilizada, porque además de ser rápida, simple y económica, es capaz de indicar el estado de las membranas y su funcionalidad. Además, también resulta patente el hecho obvio de que la motilidad espermática es un elemento indispensable para que ocurra la fecundación natural (Gadea J., 2005). Sin embargo, según diversos autores, (Selles et al., 2003; Holt et al., 1997; Gadea et al., 1998; Quintero-Moreno et al., 2004) no existe una buena correlación entre este parámetro y la fertilidad, por lo que su uso como elemento del análisis seminal porcino no ha de ser nunca el preponderante. Por otra parte, en el estudio de la calidad seminal porcina no hay que olvidar que uno de los requisitos indispensables para el adecuado metabolismo y funcionamiento de los espermatozoides es que su membrana plasmática se encuentre intacta. Entre los diferentes métodos utilizados para la evaluación de la integridad de esta membrana se incluye la realización de diferentes tinciones, entre las que destacaríamos de Eosina-nigrosina (Bamba, 1988). Sin embargo, la información sobre la estructura de la membrana que dan estas tinciones está relacionada de manera laxa, aunque importante, con la fertilidad (Quintero-Moreno et al., 2004). Probablemente, este hecho se deba a que estas pruebas sólo nos proveen información acerca de la viabilidad de la célula, pero no acerca de su funcionalidad. Por el contrario, todas aquellas pruebas basadas en la observación de la respuesta funcional del espermatozoide parecen tener un mayor peso en la evaluación de la calidad seminal porcina (Holt et al., 1997; Gadea et al., 1998; Selles et al., 2003; Quintero-Moreno et al., 2004), por lo que una profundización

en el estudio de la funcionalidad espermática permitiría una mejor optimización en el diseño y desarrollo de estas pruebas funcionales.

Existe una amplia variación de pruebas que determinan la funcionalidad espermática porcina. Así, una de las más utilizadas hoy en día es el Test de Resistencia Osmótica (ORT; Schilling et al., 1986). Esta prueba evalúa el porcentaje de acrosomas intactos tras la incubación de semen fresco en dos soluciones de diferente presión osmótica durante un periodo de incubación de 15 minutos en un medio isosmótico a 39° C (300 mOsm/kg) y de 2 horas en un medio hipo-osmótico a 39° C (150mOsm/kg). La evaluación del estado de los acrosomas después de dichos periodos de incubación permite comparar la resistencia osmótica de las membranas de distintos eyaculados, así como, resulta una importante ayuda en el intento de predicción del comportamiento de los espermatozoides, tanto en lo referente a fertilidad como en lo relativo a la capacidad de conservación (Pérez-Llano et al., 1998). Otra prueba espermática, derivada de la anterior y que ha sido utilizada para conocer el estado de las membranas del espermatozoide de cerdo, es el Test de Resistencia Hiper-osmótica (HRT; Quintero-Moreno, 2004) que nos permite evaluar tanto la viabilidad como el porcentaje de acrosomas alterados, y que también puede tener un papel importante en la mejora del análisis de calidad seminal porcina (Caiza de la Cueva., 1998). Otras pruebas funcionales que han demostrado ser de gran utilidad son la determinación del ritmo de formación de L-lactato (Rigau et al., 1996) y, por supuesto, todas aquellas basadas en la penetración (homóloga o heteróloga) y la fecundación “in vitro” (Berger and Parker.,1989;Ivanova and Mollova., 1993; Fazeli et al., 1995; Matas et al., 1996; Flowers, 1997; Xu et al., 1998; Gadea et al., 1998; Fazeli et al., 1999; Selles et al., 2003;), si bien su desarrollo práctico en condiciones de rutina es difícil debido a la infraestructura que se necesita para su correcta realización. En su conjunto, todas estas

pruebas dan una idea más o menos precisa del estado funcional del semen evaluado. Sin embargo, sería necesaria la aparición de pruebas funcionales más exactas, que aumenten aún más el grado de precisión del análisis. Sin embargo, el desarrollo de estas nuevas técnicas sólo puede ser llevado a cabo si conocemos previamente con mucha mayor profundidad los mecanismos moleculares de regulación de la funcionalidad espermática. Uno de los aspectos más importantes que explican la funcionalidad espermática es la capacidad que tiene estas células para mantener unos niveles energéticos óptimos en cada momento de su existencia. En toda célula, los niveles energéticos están estrechamente relacionados con la concentración intracelular de ATP. Siguiendo este razonamiento, el análisis de la concentración de ATP ha sido sugerido como una prueba razonable de evaluación del estado funcional espermática. Sin embargo, los resultados publicados no muestran una correlación significativa entre este parámetro con la fertilidad, ya que la medición de ATP parece tener poco valor diagnóstico en predecir la capacidad fecundante cuando es evaluada por análisis de multivarianza (Gadea, 2005). Este resultado implica que el mantenimiento del nivel energético espermático depende no solamente de los niveles intracelulares de ATP, si no también de cómo se alcanzan y regulan estos niveles. Teniendo en cuenta esto, resulta evidente que el estudio de cómo el espermatozoide porcino adquiere y modula niveles energéticos frente a cambios en las condiciones ambientales adquiere una grandísima importancia en la comprensión la funcionalidad espermática.

El espermatozoide de cerdo tiene la habilidad de utilizar una amplia variedad de sustratos para obtener energía. Algunos no son monosacáridos, como el lactato (Jones, 1997), el piruvato (Jones, 1997), el glicerol o el glicerol 3-fosfato (Jones et al, 1992). Sin embargo, los monosacáridos parecen ser la fuente principal de energía. Así, el espermatozoide de cerdo tiene la habilidad de metabolizar con alta eficiencia los

azúcares presentes en el plasma seminal, tal y como la glucosa (Jones y Connor, 2000; Marín et al., 2003) o la fructosa (Jones y Connor, 2000). La vía principal que el espermatozoide de cerdo utiliza para metabolizar estos azúcares es la glucólisis, puesto que la energía obtenida a través de la metabolización de monosacáridos como la glucosa a través de otras vías como el ciclo de Krebs sólo es alrededor de un 5% del total de energía producida por este azúcar (Marín et al., 2003). Este resultado concuerda con el hecho que la glucólisis juega el papel principal en el suministro de ATP destinado al movimiento (Mukai y Okuno, 2004), a pesar del punto de vista tradicional que indica que el ciclo de Krebs y la actividad mitocondrial y no la glucólisis mantienen la motilidad. Por otro lado, la utilización de azúcares a través de otras vías metabólicas alternativas en el espermatozoide de cerdo esta en discusión. Así, mientras que algunos autores no han encontrado la presencia de ninguna de estas vías, tal y como la glucogénesis utilizada como mecanismo de reserva energética, (Mukai y Okuno, 2004), otros trabajos detectaron la presencia de dicho mecanismo de reserva energética en diversas especies, entre ellas la porcina (Ballester et al., 2000). Igualmente, mientras que la teoría generalmente aceptada, así como los datos publicados, indican que el espermatozoide de cerdo carece de una vía gluconeogénica funcional (Marín et al., 2003), algunos autores teorizan que esta vía puede estar activa en espermatozoides de verraco, en similitud a lo observado en otras especies, como el perro, en la cual se observa la presencia de una gluconeogénesis funcional e importante para completar la capacitación “in vitro” en un medio sin azúcares (Albarracín et al., 2004; Mukai y Okuno, 2004). Todas estas discrepancias resaltan la falta de suficientes estudios que permitan la exposición de una hipótesis unificada que explique los mecanismos regulatorios ligados al metabolismo energético en el espermatozoide de cerdo.

Uno de los puntos más intrigantes respecto al metabolismo energético del espermatozoide de cerdo es la diferente capacidad que presentan estas células para utilizar monosacáridos asimismo diferentes. Así, la bibliografía indica que el espermatozoide de cerdo utiliza de una manera más eficiente la glucosa que la fructosa, tal y como indica un incremento en el ritmo de síntesis de ATP (Jones y Connor, 2000). Esto reviste gran importancia ya que la glucosa y la fructosa no son utilizadas sólo como mero sustrato energético, si no que también son utilizados como moduladores funcionales específicos, al menos en algunas especies. En relación con este punto, se ha descrito que el porcentaje de fecundación “in vitro” de espermatozoides de ratón es mucho mayor en un medio presencia de glucosa que con concentraciones iguales de fructosa o manosa (Roger y Perreault, 1990). Este resultado parece relacionarse con la existencia de cambios específicos en la membrana plasmática dependientes de glucosa que ocurren durante la capacitación “in vitro” y la penetración (Fraser y Herod, 1990). Por otro lado, la incubación con glucosa y fructosa indujo cambios específicos en el patrón de fosforilación en residuos de tirosina (Tyr-Phos) de espermatozoides de perro de eyaculados frescos (Rigau et al., 2002), indicando que ambos azúcares actúan de manera distinta y específica sobre la funcionalidad global de estas células. Todos estos datos indican que un conocimiento preciso de de las vías específicas de utilización de los diferentes monosacáridos pueden ser de máxima importancia para entender los mecanismos que controlan la funcionalidad “in vivo” del espermatozoide de cerdo.

A pesar de la evidente importancia de los monosacáridos, no hay que olvidar, que el espermatozoide porcino, como ya se ha dicho antes, también es capaz de utilizar sustratos no monosacáridos como fuente de energía. Sin embargo, la utilización de estos sustratos no está bien estudiada, así como no se comprende demasiado bien su utilidad. Una particularidad de los sustratos no monosacáridos es que si bien hay

algunos, como el glicerol, que serán utilizados a través de la vía glucolítica, otros, como el lactato, el piruvato o el citrato serán utilizados a través de otras vías, como el ciclo de Krebs. Sin embargo, como ya se ha dicho, el espermatozoide porcino es eminentemente glucolítico, y la importancia de la obtención de energía a través del ciclo de Krebs parece ser baja (Marín et al., 2003). Esta contradicción pone de manifiesto el desconocimiento que tenemos de cómo el espermatozoide es capaz de utilizar sustratos no glucolíticos de manera eficiente. Esta cuestión es más importante de lo que parece, puesto que su comprensión ayudaría en gran medida, no sólo a la implantación de nuevas pruebas funcionales que permitan mejorar el análisis de calidad seminal, si no también al diseño de diluyentes en refrigeración optimizados para mantener los niveles energéticos, y por lo tanto la funcionalidad espermática, en condiciones no glucolíticas, probablemente subóptimas.

Teniendo en cuenta estos puntos, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue el de establecer los mecanismos mediante los cuales los espermatozoides de cerdo de eyaculados frescos utilizan de manera específica y diferencial diversos sustratos glucolíticos y no glucolíticos. Los sustratos glucolíticos utilizados fueron cuatro monosacáridos distintos: la glucosa, la fructosa y la manosa, que entran al metabolismo energético a través de fosforilación directa mediante la actividad hexoquinasa (Rawn, 1983; Lehninger et al., 1993), y el sorbitol, que entra en la glucólisis a través de su transformación previa en fructosa y la subsiguiente fosforilación a fructosa 6-fosfato modulada por la hexoquinasa (Newsholme and Leech, 1983). Por otra parte, los sustratos no glucolíticos utilizados fueron el L-lactato y el citrato, los cuales probablemente son utilizados a través del ciclo de Krebs. Una vez realizado este estudio se llevó a cabo un último trabajo, en el cual se diseñaron diversos diluyentes experimentales en refrigeración, basándose en diversas concentraciones combinadas de

substratos energéticos glucolíticos y no glucolíticos, con la finalidad de analizar la importancia que tiene el equilibrio en la concentración de estos substratos en el mantenimiento de la funcionalidad y la calidad seminal porcina durante la conservación en refrigeración.

2. OBJETIVOS:

2.1. Objetivo general.

El objetivo final del trabajo es el diseño de un diluyente optimizado para lo conservación a medio/largo plazo (15 días) a 16°C de muestras seminales porcinas con una mínima pérdida del potencial fertilizante.

Este objetivo final se desarrollo a través de los siguientes objetivos específicos:

2.1.1. Tomando en cuenta que la principal fuente energética del espermatozoide de mamífero es el consumo de monosacáridos, se estudió el efecto de la incubación con diferentes azúcares sobre el metabolismo energético del espermatozoide de cerdo.

Este objetivo fue desarrollado por medio de la siguiente metodología:

- Evaluación el estado funcional de los espermatozoides tras la incubación, por medio de los porcentajes de viabilidad y de acrosomas alterados, como marcadores del estado funcional espermático.

- Valoración de los cambios en los niveles intracelulares de diferentes metabolitos básicos en el mantenimiento de los niveles energéticos, como la glucosa 6-fosfato (G 6-P), el glucógeno y trifosfato de adenosina (ATP) inducidos por la incubación con las diferentes hexosas (glucosa, fructosa, manosa y sorbitol).

- Determinación del ritmo de formación de L-lactato como producto de la vía glucolítica y de CO₂ como producto del ciclo de Krebs.

- Evaluación de las dos principales actividades enzimáticas que controlan la glucólisis, como son la actividad hexoquinasa, que regula la fosforilación inicial de las hexosas, y la piruvato quinasa, que regula la introducción del producto final de la glucólisis en el ciclo de Krebs o bien a la formación de lactato extra celular.

2.1.2. Conociendo la habilidad de los espermatozoides de cerdo de utilizar sustratos no monosacáridos como fuentes alternativas de energía cuando no dispone de monosacáridos glicolizables en el medio en el que se encuentra, estudiamos el efecto de la incubación con citrato o lactato sobre el metabolismo de los espermatozoides porcinos. Para ello, se incubaron nuevamente los espermatozoides porcinos, pero esta vez utilizamos citrato o lactato como único sustrato energético. En esta ocasión también valoramos la viabilidad y el estado de los acrosomas, así como los niveles intracelulares de metabolitos energéticos producto de la utilización del citrato y el lactato. Además, se determinaron los ritmos de formación de L-lactato y CO₂ extracelulares como productos finales del metabolismo. Por último, determinamos la actividad lactato deshidrogenasa (LDH), por ser este un punto importante de modulación en la vía de entrada directa de cualquier sustrato hacia el ciclo de Krebs.

2.1.3. Finalmente, diseñamos varias fórmulas de diluyentes para la conservación de semen porcino refrigerado entre 15-17°C, que combinaron diversas concentraciones de un monosacárido, siempre a niveles por debajo de los niveles utilizados por todos los diluyentes existentes utilizados para este fin, y diversas concentraciones de un sustrato no glucolítico. Los diferentes diluyentes así diseñados se compararon entre ellos y con un diluyente estándar (diluyente BTS), que ha sido utilizado con éxito en el mercado de

la inseminación artificial porcina para conservar semen refrigerado. Estas comparaciones nos permitieron determinar la diversa eficiencia que las diferentes combinaciones de sustratos energéticos tienen sobre la conservación del semen porcino en refrigeración.

3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albarracín JL, Fernández-Novell JM, Ballester J, Rauch MC, Quintero-Moreno A, Peña A, Mogas T, Rigau T, Yáñez A, Guinovart JJ, Slebe JC, Concha II and Rodríguez-Gil JE. 2004. Gluconeogenesis-linked glycogen metabolism is important in the achievement of in vitro capacitation of dog spermatozoa in a medium without glucose. *Biol Reprod* 71: 1437-1445.

Amann RP, Hammerstedt RH. 2002. Detection of differences in fertility. *J Androl* 23:317–25.

Althouse GC, 1997. Comparison of currently used semen extenders in the swine industry. *Compend Cont Educ Pract Vet* 19: 777-782.

Althouse GC, Wilson ME, Kuster C, Parsley M. 1998. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology*. 50 :535-43.

Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl* 21:1–7.

Ballester J, Fernandez-Novell JM, Rutllant J, Garcia-Rocha M, Jesus Palomo M, Mogas T, Pena A, Rigau T, Guinovart JJ and Rodriguez-Gil JE 2000 Evidence for a functional glycogen metabolism in mature mammalian spermatozoa *Mol Reprod Develop* 56: 207–219.

Bamba K, 1988. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using a eosin–nigrosin stain. *Theriogenology* 29: 1245–1251.

Berger T, Parker K. 1989. Modification of the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility and correlation with in vivo fertility. *Gamete Res.* 22:385-97.

Caiza de la Cueva I, Rigau T, Pujol R, Piedrafita J, Rodriguez-Gil JE. 1997. Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: the role of the ionic pumps and the relationship with cryosurvival. *Anim Reprod Sci* 48:301-315.

Dube C, Beaulieu M, Reyes-Moreno C, Guillemette C, Bailey JL. 2004. Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. *Theriogenology.* 62:874-86

Fazeli AR, Holt C, SteenwegW, Bevers MM, HoltWV, Colenbrander B. 1995. Development of a sperm hemizona binding assay for boar semen. *Theriogenology* 44:17–27.

Fazeli A, Duncan AE, Watson PF, Holt WV. 1999. Sperm–oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol Reprod* 60:879–86.

Flowers WL 1997. Management of boars for efficient semen production. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 52, 67–78.

Fraser LR and Herod JE. 1990. Expression of capacitation-dependent changes in chlortetracycline fluorescence patterns in mouse spermatozoa requires a suitable glycosylable substrate. *J Reprod Fertil* 88: 611-621.

Gadea J, Matas C, Lucas X. 1998. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. *Anim Reprod Sci.* 54:95-108.

Gadea J. 2005. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology.* 63:431-44.

- Holt WV. 1997. Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reprod Fertil Dev.* 9: 309–19.
- Ivanova M, Mollova M. 1993. Zona-penetration in vitro test for evaluating boar sperm fertility. *Theriogenology* 40:397–410.
- Jones AR, Chantrill LA, Cokinakis A. 1992. Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa. *J Reprod Fertil* 94:129-134.
- Jones AR, Connor DE. 2000. Fructose metabolism by mature boar spermatozoa. *Reprod Fertil Develop* 12:355-359.
- Jones AR, Milmlow D. 1997. Endogenous energy production by mature boar spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 111:285-90.
- Johnson LA, Aalbers JG, Grooten HJG. 1988. Artificial insemination of swine: fecundity of boar semen stored in beltsville TS (BTS), modified modena (MM) or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection. *Zuchthygiene* 23: 49-55.
- Johnson LA. 2000 Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Anim Reprod Sci.* 60-61:93-107.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. 2000 “Storage of boar semen”. *Anim Reprod Sci.* 64:133-4.
- Lehninger AL, Nelson DL and Cox MM. 1993. Feeder pathways of glycolysis. In: Lehninger AL, Nelson DL and Cox MM, eds. *Principles of Biochemistry*, 2^d Edition. New York, Worth Publishers, 422-423.
- Marin, S., Chiang, K., Bassilian, S., Lee, W.N.P., Boros, L.G., Fernandez-Novell, J.M., Centelles, J.J., Medrano, A., Rodriguez-Gil, J.E. and Cascante, M. 2003. *FEBS Lett.* 554, 342–346.

- Matas C, Martinez E, Vazquez JM, Rota J, Gadea J. 1996 In vitro penetration assay of boar sperm fertility: effect of various factors on the penetrability of immature pig oocytes. *Theriogenology* 46: 503-513.
- Mukai C and Okuno M. 2004. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod* 71: 540-547.
- Newsholme EA and Leech AR. 1983. Sorbitol. In: Newsholme EA and Leech AR, eds. *Biochemistry for the Medical Sciences*. Chciester, John Wiley & sons, 470-471.
- Perez-Llano B, Garcia-Casado P, Lorenzo JL, Sánchez R. 1998. Response of the boar sperm to the HOS test and relationship between HOST and ORT results. Birmingham, England 15 th 1PVS Congress 69 abstr.
- Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE, 2004. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology* 61 673-690.
- Rawn JD. 1983. Hexokinase. In: Rawn JD, ed. *Biochemistry*. New York, Harper & Row Publishers Inc, 557-558.
- Rigau T, Rivera M, Palomo MJ, Fernandez-Novell JM, Mogas T, Ballester J, Peña A, Otaegui PJ, Guinovart JJ, Rodriguez-Gil JE. 2002. Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. *Reproduction* 123: 579-591.
- Rogers BJ, Perreault SD. 1990. Importance of glycosylable substrates for “in vitro” capacitation of human spermatozoa. *Biol Reprod* 43: 1064-1069.
- Selles E, Gadea J, Romar R, Matás C, Ruiz S. 2003. Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. *Reprod Domest Anim* 38:66–72.

Schilling E, Vengust M, Bajt G, Tomcic M. 1986. The osmotic resistance (ORT) of boar spermatozoa and the relation to pregnancy rate and litter size. In: 9th IPVS Congress, Barcelona. p. 77.

Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.* 60-61:481-92. Xu, X., Pommier, S., Arbov, T., Hutchings, B., Sotto, W., Foxcroft, G.R., 1998. In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. *J. Anim. Sci.* 76, 3079–3089.

CAPÍTULO II:

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El uso de la inseminación artificial (IA) en la producción porcina se ha incrementado dramáticamente durante las últimas décadas, ya que según las últimas estimaciones en el mundo se realizan unas 19 millones de inseminaciones, de las cuales casi la totalidad (99%) se realizan con semen refrigerado a 15-20°C, hecho que ha favorecido la diseminación del material genético del verraco (Gadea J., 2004). El semen porcino utilizado para AI es colectado, analizado y posteriormente diluido en una gran variedad de diluyentes comerciales. Una vez diluido, es enfriado a 15-18° C y mantenido a esa temperatura por varios días hasta su utilización para la I.A. Como norma práctica, el almacenamiento de semen a esa temperatura durante dos días es habitualmente utilizado en las técnicas de inseminación artificial (Kamp et al., 2003). Como en otras especies, en las cuales la conservación del semen se realiza rutinariamente, el enfriamiento del semen diluido ayuda a preservar la longevidad de los espermatozoides por depresión de su actividad metabólica, hecho que reduce significativamente el consumo de energía y la formación de subproductos potencialmente tóxicos, como el lactato (Althouse et al., 1998).

Al determinar la habilidad específica de los espermatozoides de cerdo para la utilización separada de monosacáridos como fuente energética a través del ciclo de Krebs y la glicólisis podremos obtener nuevos conocimientos que nos permitan diseñar un diluyente óptimo para la conservación de semen refrigerado a largo plazo. En este sentido, hay que recordar, en primer lugar que los espermatozoides de mamíferos son células móviles, altamente compartimentizadas, que tienen dos estructuras básicas: 1) la cabeza, que contiene el núcleo y el acrosoma, y 2) el flagelo que contiene las mitocondrias y el axonema (Vázquez y Roldán., 1997).

Los espermatozoides requieren una producción permanente de ATP para mantener la estructura celular, la composición de iones intracelulares y la motilidad. Los espermatozoides maduros de cerdo, igual que otros espermatozoides de mamíferos, pueden utilizar varios sustratos extra e intracelulares para la obtención de energía. La principal vía catabólica en los espermatozoides de cerdo eyaculados, parece ser la fermentación de glucosa o fructosa extracelular a lactato y, si hay oxígeno disponible, la oxidación de lactato a CO_2 y HO_2 (Jones., 1997, Kamp et al., 2003). Por otra parte, en presencia del inhibidor 5 α -clorhidrina, este proceso de conversión de glucosa o fructosa a lactato se inhibe y se produce una acumulación de fructosa 1, 6 bifosfato y dihidroxiacetona fosfato, lo cual disminuye la capacidad de los espermatozoides afectados de generar ATP a partir de azúcares glucolisables (Jones and Montague., 1991). La razón para la producción aeróbica de lactato es probablemente debida a la estricta compartimentación de la producción de ATP respiratoria en la pieza intermedia del flagelo del espermatozoide, el único sitio donde se localizan las mitocondrias (Kamp et al., 2003).

Entre los sustratos energéticos endógenos identificados en los espermatozoides maduros de cerdo está el glicerol 3- fosfato, así como otros di- o triglicéridos. Otra fuente de sustratos endógenos parecen ser los fosfolípidos de la membrana, los cuales pueden dar lugar, por degradación, a la producción de glicerol 3-fosfato, el cual es rápidamente metabolizado (Jones and Bubb., 2000).

Todos estos datos indican, pues, que los espermatozoides son capaces de usar un amplio espectro de sustratos, tanto exógenos como endógenos, para el mantenimiento de sus funciones metabólicas. Entre los principales sustratos se encuentran diversos monosacáridos que pueden ser utilizados para la obtención de energía, en forma de ATP, necesaria para las diversas funciones celulares (Storey BT., 1975), especialmente

la motilidad (Bohnesack and Halangk., 1986). Aunque el sustrato metabólico usado por los espermatozoides para la generación de ATP varía entre las distintas especies, los espermatozoides maduros de cerdo pueden utilizar diversos sustratos glucolisables (fructosa, glucosa, etc.), lactato y, en limitados casos, de ácidos grasos de cadena corta como el acetato y el propionato (Jones and Bubb., 2000).

El papel que tiene el mantenimiento de los niveles energéticos en el espermatozoide es vital para conseguir un estado funcional óptimo de las células en cada momento de su ciclo vital. Así, los cambios en las propiedades de la membrana plasmática, y particularmente de sus conductancias iónicas, en respuesta a factores ambientales han mostrado ser poderosos reguladores del metabolismo y la activación de la motilidad en espermatozoides de diferentes especies. Este hecho llega al extremo de que el pH interno juega el rol de un segundo mensajero. También se ha propuesto que la inhibición de la motilidad de los espermatozoides de varias especies entre ellas el cerdo (Dacheux and Paquignon., 1980), en el epidídimo caudal es atribuible a un pH intracelular ácido debido a la presencia de lactato (Gatti et al., 1993). Por lo tanto resulta evidente la existencia de una relación estrecha entre el pH y la producción de energía.

En las células eucariotas, el pH intracelular es controlado por el intercambio sodio-protones y por el transporte de bicarbonato, así como por la permeabilidad de la membrana plasmática a los protones, el poder tampón de la célula y el potencial de la membrana plasmática (Frelin et al., 1988; Gatti et al., 1993). El lactato ha sido implicado como un importante sistema regulador del pH de los espermatozoides de mamífero y por tanto el lactato podría jugar un papel en el control del pH interno de los espermatozoides eyaculados de cerdo (Gatti et al., 1993) dando lugar así a un vínculo entre la obtención de energía la cual irá ligada también a los mecanismos de gestión energética subyacentes y el mantenimiento del pH. Estos hallazgos enfatizan la

importancia de la mayor o menor capacidad tamponadora de los diluyentes de semen. Por lo tanto la elección de unos niveles adecuados de sustratos energéticos y, a la vez, mantenedores de pH es vital para el diseño de un diluyente, dependiendo del tipo de uso que se vaya a hacer de él. Así, el diseño será diferente si solo se pretende conservar dosis seminales durante dos ó tres días, que si se requiere conservar por más tiempo. En el primer caso la elección más racional sería la elección de un diluyente de corta duración, cuyos resultados en la actualidad son muy similares a los de los diluyentes de larga duración, presentando ambos concentraciones de sustratos diferentes (Gadea J., 2003). De todo lo dicho anteriormente se trasluce pues que, aunque ha transcurrido casi un siglo desde el inicio de la utilización de I.A. porcina, el conocimiento sobre los procesos de conservación de los espermatozoides de cerdo es aún limitado. Esto hace necesario profundizar en los estudios para el diseño de nuevos diluyentes y para ello es indispensable un mayor conocimiento de la célula espermática y su metabolismo, así como la utilización de nuevos sistemas que permitan evaluar y optimizar los componentes de dichos diluyentes (Pettit et al.,1999). El principal objetivo de un diluyente es el de permitir multiplicar el número de dosis seminales obtenidos a partir de un eyaculado, y dependiendo del tipo de diluyente pueden obtenerse además beneficios adicionales tales como: proveer de nutrientes para la obtención de energía, proteger al espermatozoide del choque por frío, control de las fluctuaciones del pH a través de su capacidad tamponadora, mantenimiento de un apropiado balance osmótico e inhibición del crecimiento bacteriano (Althouse., 1997).

Los espermatozoides de cerdo son muy sensibles al enfriamiento, posiblemente a causa de la baja proporción de colesterol de sus membranas. Así, Watson (1995) observó que la exposición de espermatozoides a bajas temperaturas acortaba el tiempo de capacitación, con cambios en la arquitectura de los lípidos de la membrana, así como

en su permeabilidad y una reducción en la eficiencia de las enzimas homeostáticas y en consecuencia, todos estos cambios influyen la subsiguiente fertilidad de los espermatozoides (Holt., 2000). De hecho, el enfriamiento y la congelación inducen cambios parecidos a la capacitación en los espermatozoides de varias especies, incluido el cerdo. Conociendo el hecho de que para poder fecundar al ovocito los espermatozoides deben capacitarse en el tracto genital de la hembra, y de que la capacitación está asociada con la fosforilación de tirosinas de las proteínas espermáticas, podemos decir que la dilución del semen en sí puede provocar modificaciones en la fisiología del espermatozoide que podrían reducir su capacidad fertilizante (Dubé et al., 2004). Un aspecto muy relacionado al enfriamiento es la osmolaridad, ya que este es un parámetro dependiente de la temperatura.

Las células eucariotas son muy sensibles a situaciones de osmolaridad inadecuadas como las que se producen a bajas temperaturas. Por ello las células tienen varios mecanismos para reaccionar ante cambios en la osmolaridad del medio. En este punto, la actividad de las bombas iónicas es muy importante para el mantenimiento de la osmolaridad intracelular. Teniendo en cuenta lo expuesto, es fácil entender que la injuria que produce la congelación en la célula está relacionada en gran medida con grandes cambios de presión osmótica producidos durante los procesos de congelación y descongelación. Durante la congelación se forman gotas hiperosmóticas de líquido intracelular no congelado. La formación de estas gotas minimiza las lesiones intracelulares provocadas por la formación de cristales de hielo. El porcentaje de agua osmóticamente inactiva dentro del espermatozoide de cerdo es casi dos veces más que en el espermatozoide del hombre o el del toro. Esto implica que la formación de estas gotas hiperosmóticas en el espermatozoide de cerdo durante la congelación es mucho más reducida que en los espermatozoides del hombre o del toro, aumentando así la

posibilidad de lesiones ligadas a cristales de hielo. Por lo tanto queda de manifiesto una vez más que el mantenimiento de la osmolaridad, ligado a un equilibrio correcto energía/pH, es vital para la funcionalidad espermática (Rigau et al., 1995).

Por lo tanto, viendo la importancia que tiene la regulación de aspectos imbricados entre sí, como la osmolaridad, el pH y los niveles energéticos, emerge una pregunta importante. ¿Cuales son los mecanismos moleculares que regulan estos aspectos y en qué lugar se llevan a cabo? Sobre la segunda parte de la pregunta, cabe recordar que el espermatozoide es una célula muy peculiar, que tiene a su membrana plasmática como principal centro regulador de su funcionalidad (Eddy, 1988). El estudio de la funcionalidad de la membrana espermática o plasmalema es de particular importancia, ya que se requiere una membrana bioquímicamente activa en cualquier punto de la vida del espermatozoide, como en los procesos de capacitación, reacción acrosómica y la unión del espermatozoide a la superficie del ovocito. La funcionalidad de la membrana puede ser determinada mediante algunas pruebas, tales como la ORT y el HOS, que permiten conocer si una membrana intacta es bioquímicamente activa (Gadea et al., 1998).

El papel de la membrana plasmática en la comunicación entre la célula espermática y el medio externo es esencial, y envuelve el transporte de iones a través de la membrana, la unión de diferentes factores a receptores específicos y el mantenimiento del potencial de membrana (Gatti et al., 1993; Harrison, 1997; Murase et al., 2004; Petrunkina et al., 2005; Jang and Yi., 2005; Maldjian et al., 2005; Guthrie and Welch., 2005). Por otra parte, la presencia de transportadores de sustratos energéticos, como los transportadores de hexosas GLUT-3, GLUT-5 y SGLT (Angulo et al., 1998; Rigau et al., 2002) indica que el plasmalema puede jugar un papel muy importante en la regulación energética y el mantenimiento de los niveles de ATP. Así, los espermatozoides necesitan producir

ATP para mantener el movimiento del flagelo y para la señal de transducción modulada mediante la fosforilación de proteínas. Hay dos vías para la producción de ATP en los espermatozoides de mamíferos, la glucólisis y la respiración mitocondrial. Sobre la obtención de estos sustratos “in vivo”, hay que recordar que en el fluido seminal de varios mamíferos han sido encontrados sustratos glucolisables (Povoa et al., 1986; Mann et al., 1981; Frenkel et al., 1975; Nichol et al., 1992; Hamner, 1973). Enzimas relacionadas con la glucólisis han sido localizadas en la cola del espermatozoide de cerdo (Westhoff et al., 1997). De igual forma, varios estudios han documentado la relación existente entre la glucólisis y las señales celulares dependientes de la capacitación. (Travis et al., 2001; Urner et al., 2001). También ha sido demostrado que los sustratos glucolisables juegan un rol importante en la capacitación de los espermatozoides y en la penetración de la zona pelúcida (Mukai and Okuno., 2004).

Los espermatozoides de cerdo y otros mamíferos muestran una inusual y estrecha unión de enzimas glucolíticas a estructuras celulares. Carbohidratos y lípidos son el combustible para la motilidad en los espermatozoides. Los ácidos grasos solo pueden ser utilizados aeróbicamente, mientras que los carbohidratos pueden ser usados para la producción de ATP bajo condiciones anaeróbicas, pero tienen la desventaja de que su producción es unas 18 veces menos ATP por cada mol de glucosa. En espermatozoides de mamíferos, los azúcares pueden ser usados para producir ATP, pero no almacenan glucógeno y en consecuencia la motilidad depende de algún combustible exógeno (Kamp et al., 1996). A pesar de ello, Marín y colaboradores (2003) demostraron que la glucólisis juega un importante papel como fuente de energía en los espermatozoides de cerdo, al producir lactato; piruvato y una pequeña cantidad de glucógeno. Cuando hay sustratos extracelulares, los espermatozoides metabolizan esos sustratos por glucólisis para proveer la energía para el movimiento flagelar, pero cuando hay poco sustrato

para glucólisis los espermatozoides metabolizan substratos respiratorios (Mukai and Okuno., 2004).

Los espermatozoides maduros pueden utilizar glucosa y fructosa como fuentes externas de energía, indicando con esto que ellos poseen un eficiente sistema de transporte para la utilización de azúcares extracelulares. En diferentes mamíferos ha sido demostrada la expresión de transportador de glucosa (GLUT3) (Haber et al., 1993) y transportador de fructosa (GLUT5) (Burant et al., 1992; Rand et al., 1993). Cada isoforma de transportadores de hexosas presenta distintas propiedades funcionales, incluyendo la habilidad para transportar diferentes hexosas. La presencia de transportadores de hexosas en espermatozoides de mamíferos puede ser particularmente relevante en el rol funcional propuesto para la vitamina C en la fisiología normal de los espermatozoides (Angulo et al., 1998).

Todos estos datos permiten inferir que el control del metabolismo energético en espermatozoides porcinos será llevado a cabo por mecanismos dinámicos, adaptados a las condiciones rápidamente cambiantes del medio, y ligados a estructuras celulares concretas, como las mitocondrias o puntos concretos del plasmalema.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Althouse GC, 1997. Comparison of currently used semen extenders in the swine industry. *Compend Cont Educ Pract Vet* 19, 777-782.

Althouse GC, Wilson ME, Kuster C, Parsley M. 1998. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology* 50: 535-43.

Angulo C, Rauch MC, Droppelmann A, Reyes AM, Slebe JC, Delgado-Lopez F, Guaiquil VH, Vera JC Concha IL 1998. Hexose transporter expression and function in

mammalian spermatozoa: cellular localization and transport of hexoses and vitamin C J Cell Biochem 71: 189–203.

Bohnensack R, Halangk W 1986. Control of respiration and of motility in ejaculated bull spermatozoa. Biochim Biophys Acta. 850: 72-9.

Caiza de la Cueva FI, Rigau T, Pujol R, Piedrafita J, Rodriguez-Gil JE. 1997. Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: the role of the ionic pumps and the relationship with cryosurvival. Anim Reprod Sci; 48:301-315.

Dacheux JL, Paquignon M. 1980. Relations between the fertilizing ability, motility and metabolism of epididymal spermatozoa. Reprod Nutr Dev 20 : 1085-99.

Dube C, Beaulieu M, Reyes-Moreno C, Guillemette C, Bailey JL. 2004. Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. Theriogenology.62: 874-86.

Eddy ER. The spermatozoon. 1988 En: Knobil E, Neill JD (eds) The Physiology of Reproduction . New York, Raven Press, 28-40.

Frelin C, Vigne P, Ladoux A, Lazdunski M. 1988. The regulation of the intracellular pH in cells from vertebrates. Eur J Biochem. May 174: 3-14.

Frenkel G, Peterson RN, Freund M. 1975. Oxidative and glycolytic metabolism of semen components by washed guinea pig spermatozoa. 26:144–147.

Gadea J, Matas C, Lucas X. 1998. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. Anim Reprod Sci. 54: 95-108.

Gadea J 2003. Los diluyentes de inseminación Artificial Porcina. Spanish Journal of Agricultural Research 1: 17-27

Gadea J, Selle's E, Marco MA. 2004. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. Reprod Domest Anim 39:1–6.

- Gatti JL, Chevrier C, Paquignon M and Dacheux JL 1993. External ionic conditions, internal pH and motility of ram and boar spermatozoa *Journal of Reproduction and Fertility* 98 439–449
- Guthrie HD, Welch GR. 2005. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology*. 63: 396-410.
- Hamner CE. 1973. Oviductal fluid-composition and physiology. In: Greep RO, Astwood EB (eds.), *Handbook of Physiology*. Washington, DC: American Physiological Society:141–151.
- Holt WV 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*. 53: 47-58.
- Jones AR 1997 Metabolism of lactate by mature boar spermatozoa *Reproduction, Fertil Develop* 9 227–237
- Jones AR and Bubb WA 2000. Substrates for endogenous metabolism by mature boar spermatozoa *J Reprod Fertil* 119 :129–135
- Jones AR, Montague MD 1991. Metabolism of fructose-1,6-bisphosphate by mature boar spermatozoa *Reprod Fertil Dev* 3:609-13.
- Kamp G, Busselmann G, Lauterwein J. 1996. Spermatozoa: models for studying regulatory aspects of energy metabolism. *Experientia*. 52 : 487-94.
- Kamp G, Busselmann G, Jones N, Wiesner B, Lauterwein J 2003. Energy metabolism and intracellular pH in boar spermatozoa. *Reproduction* 126 :517-25.
- Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi T, Cerolini S, Penny P, Noble R 2005. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology*. 63:411-21.
- Mann T, Lutwak-Mann C. 1981. *Male Reproductive Function and Semen*. Berlin: Springer Verlag:1–34.

Mukai C, Okuno M 2004. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod.* 71 : 540-7.

Murase T, Imaeda N, Kondoh N, Tsubota T 2004. Ceramide enhances acrosomal exocytosis triggered by calcium and the calcium ionophore A23187 in boar spermatozoa. *J Reprod Dev.* 50: 667-74.

Nichol R, Hunter RHF, Gardner DK, Leese HJ, Cooke GM. 1992. Concentrations of energy substrates in oviductal fluid and blood plasma of pigs during the peri-ovulatory period. *J Reprod Fertil* 96:699–707.

Pettit M.J., Plante C., Pollard J.W. 2000. Long term fresh extender development by simplex optimisation. IV Int. Conf. Boar Semen Preservation. Beltsville. P16.

Petrunkina AM, Volker G, Weitze KF, Beyersbach M, Topfer-Petersen E, Waberski D 2005. Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. *Theriogenology.* 63: 2278-99.

Povoa H, Bastos JJ, Silva ME, Ariza A, Moraes MIC, Rodrigues RB, Silva MS. 1986. Glucose in human semen. *Biomed Biochim Acta* 45:685–686.

Rigau T, Caiza de la Cueva F, Bonet S, Briz M, Rodriguez-Gil LE, 1995. Resistance to hyperosmotic stress of boar spermatozoa: putative role for ionic pumps. *Assisted Reprod. Technol. Androl.* 8: 101-122.

Rigau T, Rivera M, Palomo MJ, Fernandez-Novell JM, Mogas T, Ballester J, Peña A, Otaegui PJ, Guinovart JJ, Rodriguez-Gil JE. 2002. Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. *Reproduction* 123: 579-591.

Storey BT 1975. Energy metabolism of spermatozoa. IV. Effect of calcium on respiration of mature epididymal sperm of the rabbit. *Biol Reprod.* 13:1-9.

Travis AJ, Jorgez CJ, Merdiushev T, Jones BH, Dess DM, Diaz-Cueto L, Storey BT, Kopf GS, Moss SB. 2001. Functional relationships between capacitation-dependent cell

signalling and compartmentalized metabolic pathways in murine spermatozoa. *J Biol Chem* 276:7630–7636.

Urner F, Leppens-Luisier G, Sakkas D. 2001. Protein tyrosine phosphorylation in sperm during gamete interaction in the mouse: the influence of glucose. *Biol Reprod* 64:1350–1357.

Urner F, Sakkas D. 2003. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction*; 125:17–26.

Vazquez JM, Roldan ERS .1997 Phospholipid metabolism in boar spermatozoa and role of diacylglycerol species in the *de novo* formation of phosphatidylcholine *Mol Reprod Develop* 47: 105–112

Watson PF. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod fertil dev.* 7: 871-89

Westhoff D, Kamp G. 1997. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is bound to the fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *J Cell Sci* 110:1821–1829

HEXOKINASE AND PYRUVATE KINASE STEPS REGULATE THE SPECIFIC UTILIZATION OF MONOSACCHARIDES IN BOAR SPERMATOZOA FROM FRESH EJACULATES

Antonio Medrano¹, Núria García-Gil², Laura Ramió¹, Josep M^a Fernández-Novell³
Alejandro Peña¹, Elisabeth Pinart², Ilona I. Concha⁴, Sergi Bonet², Teresa Rigau¹ and
Joan E. Rodríguez-Gil^{1*}

¹Unit of Animal Reproduction, Dept. Animal Medicine and Surgery, School of Veterinary Medicine, Autonomous University of Barcelona, E-08193 Bellaterra, Spain.

²Biotechnology of Porcine Reproduction, University of Girona, Campus de Montilivi, s/n, 17071 Girona, Spain.

³Department of Biochemistry and Molecular Biology and IRBB, Barcelona Science Park, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain.

⁴Institute of Biochemistry. Faculty of Sciences. Campus Isla Teja, Austral University of Chile, Valdivia, Chile.

*To whom all correspondence should be submitted

Correspondence address: Joan E. Rodríguez-Gil. Unit of Animal Reproduction. Dept. Animal Medicine and Surgery. School of Veterinary Medicine. Autonomous University of Barcelona. E-08193 Bellaterra, Spain

Phone: 34-935811045

E-mail: juanenrique.rodriquez@uab.es

Key words: boar sperm, glycolysis, monosaccharides, hexokinase, pyruvate kinase

Running title: Regulation of the specific utilization of monosaccharides by boar sperm.

To be submitted

ABSTRACT

Incubation of boar sperm from fresh ejaculates in a minimal medium with 10 mM glucose induced a fast and intense activation of glycolysis, as indicated by the observed increases in the intracellular levels of glucose 6-phosphate and ATP and the rhythm of formation of extracellular L-lactate. The effect of glucose was much more intense than that induced by other monosaccharides, like fructose, sorbitol and mannose. In this sense, extracellular levels of L-lactate reached values of 5.61 ± 0.05 $\mu\text{mol/mg}$ protein after 60 min of incubation with 10 mM glucose, whereas incubation with 10 mM fructose, mannose and sorbitol for 60 min induced lactate levels below 5 $\mu\text{mol/mg}$ protein in all cases. The greater utilization of glucose was related to a much greater sensitivity to hexokinase when compared with fructose, mannose and sorbitol. Thus, the presence of 0.5 mM glucose induced total hexokinase activity in supernatants from sperm extracts of 1.7 ± 0.1 mIU/mg protein, while the same concentration of both fructose, mannose and sorbitol induced a total hexokinase activity from 0.3 ± 0.1 mIU/mg protein to 0.60 ± 1 mIU/mg protein, whereas more intense differences were even determined in resuspended pellets from sperm extracts. On the other hand, kinetic analysis of the total pyruvate kinase activity of boar sperm indicated that this activity was greatly dependent on the presence of ADP and also showed a great affinity for phosphoenolpyruvate, with a theoretical, estimated K_m in supernatants from homogenates of 0.15-0.20 mM. Immunogold location of proteins closely related to glycolysis, like GLUT-3 hexose transporter and hexokinase-I, indicated that these proteins showed the trend to be distributed around or in the cellular membranes of both head and midpiece in a grouped manner. Finally, no concrete effects of any monosaccharide was detected in the overall tyrosine-phosphorylation pattern, suggesting that monosaccharide metabolization had no specific effect at any concrete point of boar-

sperm functionality. Summing up the data, we conclude that the first control step in the specific utilization of monosaccharides by boar sperm is regulated by the hexokinase activity, whereas pyruvate kinase is the second key control step of glycolysis. In this way, glycolysis seems to be regulated by both the specific availability of a concrete sugar and the internal equilibrium between ATP and ADP levels. Furthermore, localization of some proteins that are involved in the control monosaccharide uptake and phosphorylation suggests that glycolysis starts only at concrete points linked to the boar-sperm surface.

1. INTRODUCTION

In the last several years an increasing amount of information about the mechanism/s by which boar sperm manages its energy levels has been published. This information is of paramount importance in order to understand the mechanisms underlying the boar sperm's ability to survive and to adapt to the external conditions which often are very aggressive to sperm. Moreover, boar sperm has to adapt to sudden changes in these external conditions, associated, for instance, with their rapid pass through the female genital tract, from cervix to oviduct. As a practical point of view, information about mechanisms of energy management is also very important to optimize boar-sperm conservation, both in refrigeration and in freezing. This could be of the greatest impact in further improving the worldwide application of artificial insemination (AI) techniques in pig production. All of this explains the importance underlying the study of this specific aspect of boar-sperm function.

Boar sperm from fresh ejaculates is able to utilize a wide variety of substrates to obtain energy. Some of these are non-monosaccharides, such as lactate (Jones, 1997), pyruvate (Jones, 1997), glycerol and glycerol 3-phosphate (Jones et al., 1992). However,

monosaccharides seem to be the main energy source and, in this way, boar sperm is able to metabolize sugars present in the boar seminal plasma such as glucose (Jones and Connor, 2000; Marín et al., 2003) and fructose (Jones and Connor, 2000) with high efficiency. The main way that boar sperm from fresh ejaculates uses to metabolize these sugars is glycolysis, since the energy obtained through the metabolization of glucose using other ways like the Krebs cycle is only about of 5% of the total energy produced from the sugar (Marín et al., 2003). This agrees with the fact that glycolysis plays a major role for the ATP supplementation destined for movement (Mukai and Okuno, 2004), despite the traditional point of view, which indicates that the Krebs cycle, and hence mitochondrial activity, and not glycolysis maintains motility (Halangk et al., 1985; Folgero et al., 1993; Ruiz-Pesini et al., 1998). On the other hand, the utilization of sugars through other metabolic pathways is under discussion in boar sperm and, for example, whereas some authors have not found the presence of a glycogen metabolism that would be utilized as a system to store energy (Mukai and Okuno, 2004), we have detected the presence of a functional glycogen metabolism, based on the presence of the key enzymatic activities responsible for its maintenance (Ballester et al., 2000). Other discrepancies have evolved around other metabolic pathways, like gluconeogenesis. Thus, since it is generally established that boar sperm does not have a functional gluconeogenic pathway (Marín et al., 2003), some authors indicate that this way would be active in mammalian sperm, and hence in boar ones, in order to explain facts such as the maintenance of and “in vitro” capacitation in media without sugars (Albarracín et al., 2004; Mukai and Okuno, 2004). All of these discrepancies highlight the lack of enough studies that allow for the exposition of a unified hypothesis that can explain the regulatory mechanisms underlying energy metabolism in boar sperm.

One of the most intriguing points regarding boar-sperm energy metabolism is the different ability that these cells have in order to utilize separate monosaccharides. In this sense, it has been reported that boar sperm utilized glucose more efficiently than fructose, thus yielding a more intense rhythm of ATP synthesis (Jones and Connor, 2000). This is important, since glucose and fructose are utilized not only as mere energy substrates, but also as putative functional modulators, at least in several species. This is indicated by facts like penetration and “in vitro” fertilization rates being much higher in the presence of glucose than with the same concentrations of fructose or mannose (Rogers and Perreault, 1990). These data are related to glucose-dependent changes in the sperm membrane during “in vitro” capacitation and penetration (Fraser and Herod, 1990). On the other hand, incubation with glucose or fructose induced specific changes in the tyrosine-phosphorylation pattern (Tyr-Phos) of dog sperm from fresh ejaculates (Rigau et al., 2002), thus indicating that both sugars specifically phosphorylated single, separate proteins that affect the overall functionality of these cells in different manners. These data indicate that a precise knowledge of the differences in the metabolization rate and ways among separate monosaccharides can be of utmost importance to understand the mechanisms that control boar-sperm function “in vivo”.

The main aim of this work is to establish the mechanisms by which boar sperm from fresh ejaculates differentially utilizes four separate monosaccharides: glucose, fructose and mannose, which enter energy metabolism by direct phosphorylation through the hexokinase pathway (Rawn, 1983; Lehninger et al., 1993), and sorbitol, which enters glycolysis through an indirect pathway which requires its transformation to fructose through iditol dehydrogenase activity and further phosphorylation by hexokinase (Newsholme and Leech, 1983). For this purpose, the effect induced by the incubation of sperm cells with these sugars in the intracellular levels of glucose 6-phosphate (G 6-P),

as well as of glycogen and ATP was analyzed. Moreover, the rhythm of formation of both extracellular L-lactate and CO₂ were also determined, in order to analyze differences in the pass through glycolysis and the Krebs cycle of the separate sugars. To gain insight into the controlling mechanisms of sugar utilization, the total hexokinase activity of boar-sperm extracts in the presence of the separate phosphorylatable sugars was also determined, as well as the kinetics of the total pyruvate kinase (PK) activity. Finally, the spatial location of some proteins closely related to hexose metabolism, such as the hexose transporter GLUT-3 and hexokinase-I, was also analyzed, as well as the response of the total Tyr-Phos pattern in front of the incubation of sugars. The overall analysis of the results indicates that boar sperm phosphorylates glucose through the hexokinase step much more efficiently than fructose or mannose, glucose thus entering much more rapidly into glycolysis than the other sugars. The other key step in the regulation of boar-sperm glycolysis is PK activity, which shows itself to be greatly dependent on the intracellular ATP/ADP ratio. Thus, the efficiency of glycolysis in boar sperm depends on the type of exogenous substrate together with the intracellular levels of ATP and ADP. Furthermore, we have also shown that some key proteins in glycolysis, such as GLUT-3 and hexokinase-I, are distributed in a non-uniform manner with a tendency to grouping, hence suggesting that glycolysis is performed in boar sperm in a spatial-dependent manner. Finally, no clear effects on the overall Tyr-Phos pattern were seen after the incubation with any monosaccharide, indicating that these substrates do not specifically modulate the activity of single proteins.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Semen Collection and Processing

Boar semen was obtained from 15 healthy, sexually mature boars from a commercial farm (Servicios Genéticos Porcinos, S.L.; Roda de Ter, Spain). Boars were 6 White Belgium, 5 Large White x Pietrain, 2 Pietrain and 2 Landrace, which were 2-3 years old. The sperm-rich fraction of the ejaculates was manually collected and immediately placed in a water-bath at 37°C. The semen was immediately diluted to a concentration of 2×10^7 spermatozoa/mL in a commercial extender for refrigerated semen (MR-A extender. Kubus, S.A.; Majadahonda, Spain) and distributed in 100-mL commercial AI doses. The concentrations of these doses were calculated by using a hemocytometer cell chamber. Four of the obtained 100-mL doses were placed in a portable refrigerator at 16°C for approximately 90 min, which was the time required to arrive at the laboratory. Here, samples were centrifuged at 600 xg for 10 min at 16°C in a temperature-controlled centrifuge and were then resuspended in 50 mL of a Krebs-Ringer-Henseleit medium without sugars at 16°C (KRH- medium; pH 7.4). The sperm was again centrifuged at 600 xg for 10 min at 16°C and sedimented cells were again resuspended in 50 mL of KRH- medium. The centrifugation-resuspension step was repeated once more, in order to eliminate any remains of both seminal plasma and commercial extender. The final, 50-mL sperm suspension was again centrifuged at 600 xg for 10 min at 16°C and cells were finally resuspended in 2 mL of KRH- medium. At this moment, the resuspended cells of all 4 AI doses were pooled, and they were further equally distributed in open vials and incubated with continuous shaking at 37°C with or without additions of the tested monosaccharides at the appropriate concentrations to the medium. When stated, aliquots of the incubated sperm were taken and treated depending on the required analysis. These treatments were the following:

To determine the percentages of both viability and altered acrosomes, 30- μ L aliquots were taken and immediately stained by the Eosin-Nigrosin method (Bamba, 1988), following Quintero-Moreno et al. (2004). The percentages of both viability and altered acrosomes were established after counting 200-300 spermatozoa in each sample.

To determine the extracellular levels of lactate, as well as the intracellular content of G 6-P, glycogen and ATP, 250- μ L aliquots of the sperm suspensions were taken and immediately centrifuged at 1000 xg for 1 min, and the supernatants and cellular pellets obtained were separated and immediately frozen in liquid N_2 . Supernatants were utilized to determine lactate extracellular levels, whereas pellets were treated to determine G 6-P, glycogen and ATP content. Samples were stored at $-80^\circ C$ until analysis. In all cases, a separate 10- μ L aliquot was also collected for analysis of the total protein content of the sample.

For determination of G 6-P and ATP content, frozen cellular pellets were homogenized by sonication in 300 μ L of 10% (v/v) ice-cold $HClO_4$. Homogenates were centrifuged at 10,000 xg for 15 min at $4^\circ C$, and the resultant supernatants were neutralized with 5 M K_2CO_3 before analysis.

For determination of glycogen content, frozen pellets were homogenized by sonication with 300 μ L of ice-cold 30% (w/v) KOH and heated at $100^\circ C$ for 15 min. The obtained extracts were utilized for the analysis.

Whole, single, fresh AI boar sperm doses were immediately centrifuged at 600 xg for 10 min at $16^\circ C$ to determine the total activity of both hexokinase and PK. The sperm pellet was resuspended with 50 mL of KRH- medium, and the centrifugation-resuspension step was repeated twice more in order to completely eliminate all substances included in the medium that could affect kinetic properties of these enzymes. The final, 50-mL sperm suspension was again centrifuged at 600 xg for 10 min at $16^\circ C$.

After this, the supernatant was discarded, and the resultant cellular pellet was homogenized by sonication with 500 μL of the specific buffer for determining both hexokinase and PK activities (homogenation buffer). Homogenized samples were centrifuged at 10,000 $\times g$ for 15 min at 4°C. Enzyme activities were measured in the resultant supernatants and in the pellets, which were washed once in 500 μL of their respective homogenation buffer in order to eliminate any remaining activity associated with the supernatant. Finally, the washed pellets were resuspended in 250 μL of their respective homogenation buffer. Again, 10- μL aliquots of both supernatants and resuspended pellets were taken to determine the total protein content of the samples. The homogenation buffer specific to determine hexokinase activity was composed of 500 mM glycylglycine buffer (pH 7.4) added with 2 M KCl, 100 mM dithiothreitol, 300 IU/mL aprotinin and 100 mM phenylmethylsulphonyl fluoride. On the other hand, the homogenation buffer utilized to determine PK activity was composed of 50 mM glycylglycine buffer (pH 7.4) added with 15 mM ethylene diamino tetraacetic acid, 100 mM KF and 100 mM KH_2PO_4 .

For determination of the rate of CO_2 production, 4 pooled AI doses were processed as above, and 500- μL aliquots of the final sperm suspension in the KRH- medium were incubated for 60 min at 37°C in stoppered vials in the presence of increasing concentrations of both $[\text{U}^{14}\text{C}]$ glucose and $[\text{U}^{14}\text{C}]$ fructose. The total radioactivity count added to each vial was about 1,330,000 cpm in the case of $[\text{U}^{14}\text{C}]$ glucose and about 1,380,000 cpm in the case of $[\text{U}^{14}\text{C}]$ fructose. At the end of the incubations, a piece of filter paper soaked with 200 μL phenethylamine was placed into each of the vials, avoiding direct contact with the suspension. After the addition of 85 μL of 10% (v/v) HClO_4 to the sperm suspension, the vials were gently shaken for another 30 min, and the radioactivity in the filter paper was counted. Before addition of the radioactive

material, a 10- μ L aliquot of the cell suspension was taken to determine total protein content.

2.2. Analytical Procedures

The G 6-P levels were determined enzymatically as in Michal (1984), and following the modifications described in Rigau et al. (2002), in order to increase the precision of the analysis.

The concentrations of L-lactate (Noll, 1984), glycogen (Ballester et al., 2000) and ATP (Lambrecht and Trantschold, 1984) and the pyruvate kinase (Feliu et al., 1977) and hexokinase activities (Fernández-Novell et al., 2004) were determined following the cited enzymatic techniques. The hexokinase activity technique was modified by adding 50 mU/mL glucose 6-phosphate isomerase to the final incubation mixture in order to completely determine the total hexose 6-phosphate synthesized during the reaction, following Rigau et al. (2002). All of these techniques, as well as that of G 6-P, were adapted to a Cobas Bio autoanalyzer (Roche Biomedical; Basel, Switzerland).

Total protein content of the samples was determined by the Bradford method (Bradford, 1976), using a commercial kit (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA).

2.3. Western blot Analyses

Western blot analyses were performed on boar spermatozoa that had been homogenized by sonication in ice-cold 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 1% (w/v) dodecyl sodium sulphate (SDS) and 1M Na₂VO₄ (proportion 1:5, v/v) to avoid changes in the overall phosphorylation status of the homogenates (Western buffer). The samples were briefly boiled and were then centrifuged at 10,000 xg for 15 min at 4°C. Western blot analysis was performed in both the resultant supernatants. Sperm homogenized in the presence of Western buffer was also utilized without separation between supernatants and pellets by centrifugation. The immunological analysis of the

resultant total homogenates and supernatants was based on SDS gel electrophoresis (Laemmli, 1970), followed by transfer to nitrocellulose (Burnett, 1981). The transferred samples were tested with the antibodies at a dilution (v/v) of 1:500 (anti-GLUT 3) and 1:1,000 (anti-hexokinase-I and anti-phosphotyrosine). Immunoreactive proteins were tested using peroxidase-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Amersham; Little Chalfont, United Kingdom) and the reaction was developed with an ECL-Plus detection system (Amersham).

Dog spermatozoa used as control in some Western blot analyses were obtained from healthy, sexually mature Beagle dogs from the “Servei d’Estabulari” of the Autonomous University of Barcelona. These samples were processed in the same form as those described above for boar spermatozoa. Rat-liver extracts utilized in some Western blots as control were donated by the staff of the Barcelona Science Park.

2.4. Immunogold Technique

To carry out the immunogold technique, aliquots from the incubated samples were centrifuged at 600g for 10 min. Pellets were fixed in a 0.1 M cacodylate buffer (Caco buffer; pH 7.4) containing 3% (w/v) paraformaldehyde and 0.05% (v/v) glutaraldehyde for 2 h at 4°C. After this, fixed sperm was rinsed 4 times in Caco buffer and was further incubated twice for 15 min at 4°C in a solution of 150 mM NH₄Cl. After these incubations, samples were again rinsed 4 times in Caco buffer and dehydrated by successive passes through solutions with increasing concentrations of ethanol. Dehydrated samples were pre-included in a 2% (w/v) agar solution and then embedded in Lowicryl resin (Electron Microscopy Science; Washington, DC), inducing the polymerization of the resin by ultra-violet stimulation (wavelength: 30-40 cm) for 48h at -35°C. Samples were then thin-sectioned onto gold screens, and the immunogold technique was performed On these samples.

To perform immunogold, the samples put onto gold screens were pre-incubated with phosphate-buffered saline (PBS; pH: 7.4) containing 3% (w/v) bovine serum albumin (BSA) and 20 mM glycine for 30 min at room temperature. After this, samples were incubated with the specific primary antibody at a dilution of 1:10 (v/v) in PBS added with 3% (w/v) BSA and 0.01% (v/v) Tween-20 for 2 h at room temperature. Samples were then rinsed four times with PBS added with 3% (w/v) BSA and 0.01% (v/v) Tween-20 for 5 min at room temperature and were then incubated with a gold-conjugated swine anti-rabbit immunoglobulin (BBI International; Cardiff, United Kingdom), at a working dilution of 1:25 (v/v) in PBS added with 3% (w/v) BSA and 0.01% (v/v) Tween-20. This incubation was maintained for 1 h at room temperature. The size of gold particles was of 15 nm in diameter. Afterwards, samples were rinsed 3 times in PBS, following a new 3-times rinsing procedure with tri-distilled water. Finally, the samples were stained with uranyl acetate 2% for 15 min and lead citrate for further 5 min, following Dysktra (1992). Samples utilized as negative control were processed as above, excepting the incubation step with the primary antibody.

The presence of positive signals in the samples was analyzed by observation through a Zeiss 910 EM transmission electron microscope (Servei de Microscopia Electrònica; Autonomous University of Barcelona)

2.5. Statistical Analyses

When stated, the putative significance of the differences was calculated by either two-way ANOVA (in non-paired data) or by the Student's "t" test (in paired results).

2.6. Materials

Rat anti-GLUT 3 and anti-hexokinase-I were from Chemicon International (Termeçula, CA). Anti-mouse phosphotyrosine (PY20) was from Transduction Laboratories (Lexington, KY). [^{14}C]glucose and [^{14}C]fructose were purchased from Amersham.

Glucose, fructose, sorbitol and mannose were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All other reagents were of analytical grade and were supplied by Sigma (St. Louis, MO), Merck, BioRad (Hercules, CA) and EMS (Fort Washington, PA).

3. RESULTS

3.1. Variations in the percentages of viability and altered acrosomes in boar spermatozoa incubated in the presence or in the absence of monosaccharides

Incubation of boar sperm in a sugar-free medium induced a time-dependent, progressive decrease in the percentage of viability, which went from $90.6\% \pm 1.3\%$ at the start to $73.1\% \pm 1.1\%$ after 60 min of incubation (Fig. 1A). A similar decrease was observed when sperm cells were incubated in the presence of both 10 mM sorbitol and 10 mM mannose. However, the addition of both 10 mM fructose and 10 mM glucose almost completely counteracted this decrease after 60 min of incubation (Fig. 1A). This counteracting action of both monosaccharides was also dose-dependent, showing significant effects at sugar concentrations as low as 1 mM, and reaching a maximal effect at sugar concentrations of from 10 mM to 20 mM (Fig. 1B).

The percentage of altered acrosomes increased in a time-dependent manner in cells incubated in the absence of sugars, concomitantly with the above-described decrease of viability. Thus, as shown in Fig. 1C, the percentage of altered acrosomes went from $16.1\% \pm 0.9\%$ at Time 0 to $23.9\% \pm 1.8\%$ after 60 min of incubation. In this case, the addition of sugars did not affect this increase in any way, and both fructose and glucose were as unable as sorbitol and mannose to counteract this increase. This lack of counteracting effect was observed for all of the sugars at all of the concentrations utilized in the study, from 1 mM to 50 mM (Fig. 1C).

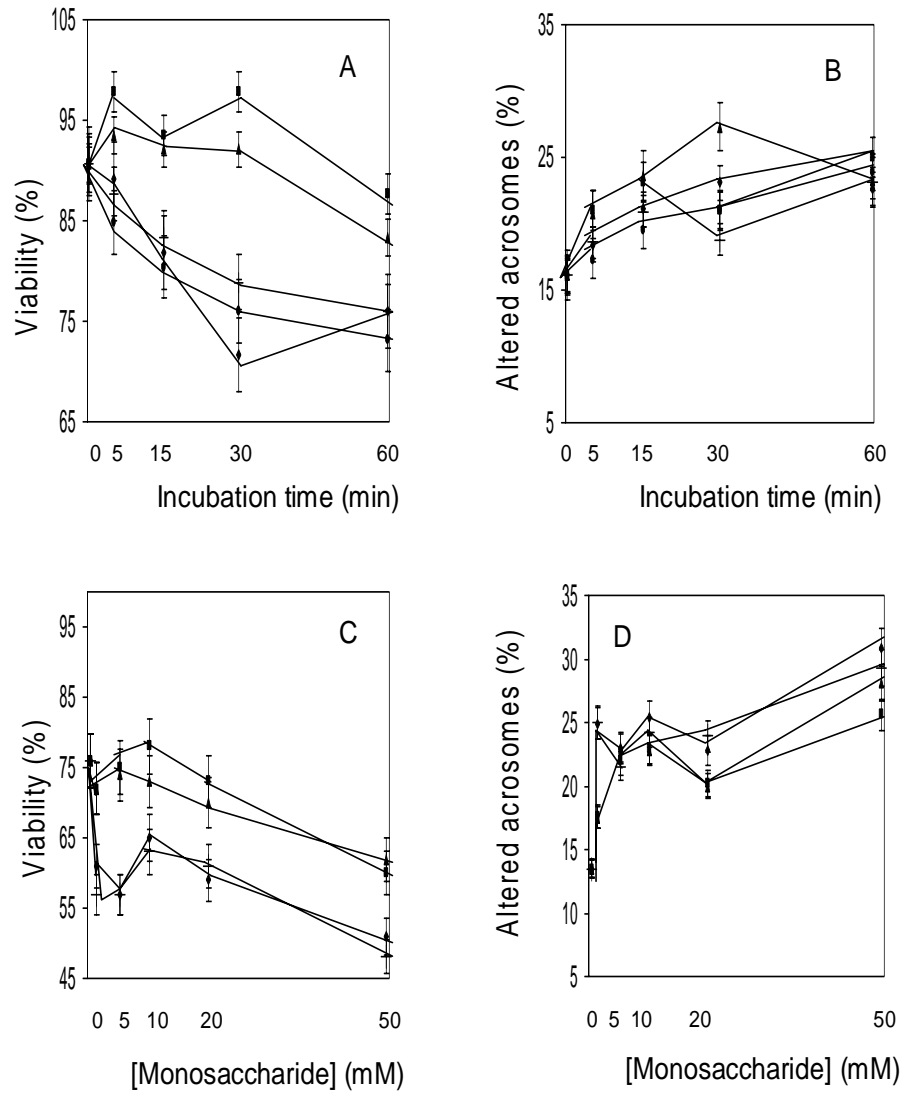


Figure 1

Figure 1. Time- and concentration-dependent effects of monosaccharides on the percentages of viability and altered acrosomes in fresh boar spermatozoa. A,C: Spermatozoa were incubated in the absence (●) or presence of 10 mM glucose (■), 10 mM fructose (▲), 10 mM mannose (◆) and 10 mM sorbitol (⊕) and, at the indicated times, aliquots were taken to determine the percentages of viability (A) and altered acrosomes (C). B,D: Spermatozoa were incubated for 60 min with increasing concentrations of glucose (■), fructose (▲), mannose (◆) and sorbitol (⊕), and aliquots were taken to determine the percentages of viability (B) and altered acrosomes (D). Results shown are means±S.E.M. for 8 separate experiments.

3.2. Effects of monosaccharides on the intracellular content of glucose 6-phosphate and glycogen in boar sperm from fresh ejaculates

Fresh boar sperm, as well as those cells incubated in a medium without sugars, did not show detectable levels of intracellular G 6-P (Fig. 2A). The incubation of sperm with 10 mM glucose induced a very fast and strong increase in G 6-P content, which reached a peak after 5 min of incubation (2.4 ± 1.8 nmol/mg protein, see Fig. 2A). The glucose-induced increase of G 6-P was transitory and, after 15 min of incubation, there were no detectable levels of the metabolite in cell extracts (Fig. 2A). Similar, although less intense effects were observed in sperm incubated in the presence of 10 mM fructose, 10 mM sorbitol and 10 mM mannose, with a peak in G 6-P intracellular levels after 5 min of incubation in all cases (Fig. 2A).

The intensity of the G 6-P peak after 5 min of incubation was dose-dependent in cells incubated with the sugars. Thus, as shown in Fig. 2B, the maximal effects were observed at concentrations of 50 mM, glucose being the sugar that showed the maximal action, with G 6-P levels of 5.3 ± 1.3 nmol/mg protein. On the other hand, fructose was not able to induce significant G 6-P levels at any of the tested concentrations (Fig. 2B).

Boar sperm from fresh ejaculates had significant levels of intracellular glycogen content, with estimated values of 56.2 ± 3.5 nmol glucose/mg protein. Glycogen content decreased slightly in cells incubated in a medium without sugars, reaching values of 41.8 ± 1.1 nmol glucose/mg protein after 60 min of incubation (Fig. 2C). As shown in Fig. 2C, the incubation of cells with sugars induced a significant increase in the intracellular glycogen content in all cases, although the effect of each sugar varied among them. Thus, the addition of 10 mM glucose induced a fast increase in glycogen content, which reached its maximal values after 15min 30min of incubation. On the contrary, incubation with both 10 mM sorbitol and 10 mM mannose induced a slower

rhythm in the increase of glycogen levels, which reached their maximal values only after 60 min of incubation. Finally, 10 mM fructose also induced a fast increase in glycogen content, which reached its peak (107.9 ± 19.1 nmol glucose/mg protein) after 30 min of incubation. However, glycogen levels further decreased, reaching values of only 56.5 ± 10.3 nmol/mg protein after 60 min of incubation (Fig. 2C). This indicates that the dynamics of glycogen synthesis is dependent on the specific substrate from which the polysaccharide is synthesized.

The hexose-induced glycogen synthesis was also concentration-dependent, although again there were differences among the sugars. Thus, the maximal effects of glucose, sorbitol and mannose were reached at sugar concentrations of 10 mM-20 mM, whereas lower concentrations had little effect on glycogen synthesis (Fig. 2D). On the contrary, the maximal effects of fructose was reached at concentrations as low as 5 mM, and there were only a slight increase at 50 mM fructose (Fig. 2D).

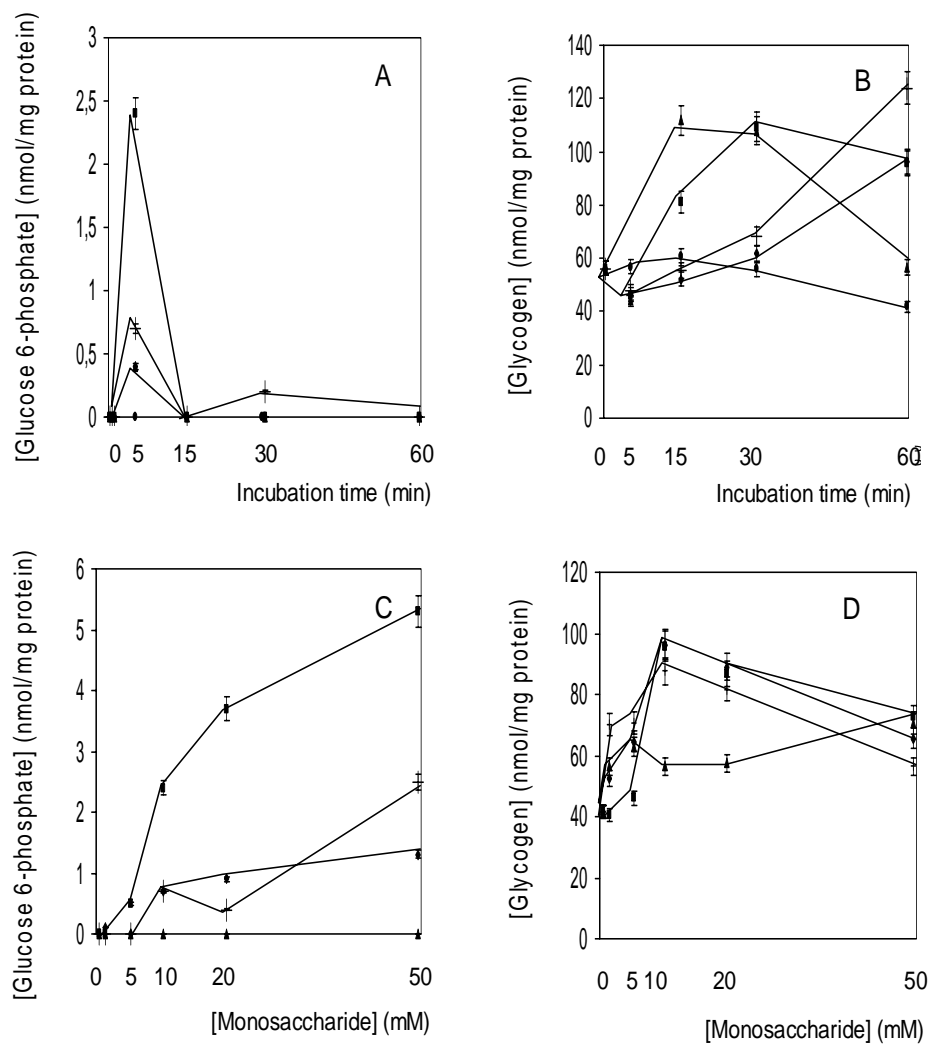


Figure 2

Figure 2. Time- and concentration-dependent effects of monosaccharides on the intracellular levels of glucose 6-phosphate and glycogen in fresh boar spermatozoa. A,C: Spermatozoa were incubated in the absence (●) or presence of 10 mM glucose (■), 10 mM fructose (▲), 10 mM mannose (◆) and 10 mM sorbitol (⊕) and, at the indicated times, aliquots were taken to determine the intracellular levels of glucose 6-phosphate (A) and glycogen (C). B,D: Spermatozoa were incubated for 5 min (B) or 60 min (D) with increasing concentrations of glucose (■), fructose (▲), mannose (◆) and sorbitol (⊕), and aliquots were taken to determine the intracellular levels of glucose 6-phosphate (B) and glycogen (D). Results shown are means±S.E.M. for 8 separate experiments.

3.3. Effects of monosaccharides on the intracellular content of ATP in boar sperm from fresh ejaculates

Incubation of boar sperm in a medium without sugars resulted in a progressive decrease in intracellular ATP content, which reached values below 2 nmol/mg protein after 60 min of incubation (Fig. 3A). All of the tested monosaccharides caused a very fast and strong increase in ATP at concentrations of 10 mM, with a maximal effect in all cases after only 1 min of incubation (Fig. 3A). This maximal effect was similar with glucose, fructose and sorbitol, reaching values of about 20 nmol/mg protein. The increase of ATP was less intense in cells incubated with 10 mM mannose, which only yielded values of 17.3 ± 1.8 nmol/mg protein after 1 min of incubation (Fig. 3A). After this peak, there was in all cases, a progressive, time-dependent decrease on ATP levels that was roughly similar regardless of the utilized sugar. It is noteworthy that intracellular ATP levels of cells incubated with sugars were maintained in all cases at values between 10 nmol/mg protein and 15 nmol/mg protein after 30-60 min of incubation, which were much greater than those determined in cells incubated without sugars during the same period of time (Fig. 3A).

The effects of monosaccharides on ATP were also dose-dependent. As shown in Fig. 3B, boar sperm was very sensitive to sugars in this respect and, thus, a near maximal effect was attained at concentrations of monosaccharides as low as 1-5 mM, and only glucose and fructose attained slightly greater ATP levels at sugar concentrations of 20 mM.

3.4. Effects of monosaccharides on L-lactate production in boar spermatozoa

Sugars caused, in all cases, a progressive, time-dependent increase in the extracellular levels of L-lactate, reaching maximal values after 60 min of incubation. Nevertheless, some differences in the rhythm of L-lactate formation could be appreciated among these

sugars. Thus, whereas 10 mM sorbitol induced a great increase during the first 30 min of incubation, following with a further maintenance of L-lactate levels, 10 mM glucose, 10 mM fructose and 10 mM mannose showed a more constant increase in rhythm. It is also noteworthy that 10 mM glucose rendered the maximal L-lactate values after 60 min of incubation, with levels of 5.61 ± 0.05 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein, whereas 10 mM fructose and 10 mM sorbitol rendered lower L-lactate levels (Fig. 3C). The monosaccharide that induced the lowest L-lactate production was mannose, with values of 3.24 ± 0.03 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein after incubation for 60 min at concentrations of the sugar of 10 mM (Fig. 3C).

Again, the effects of sugars on L-lactate production were dose-dependent and also very sensitive to low concentrations of the effectors. In this way, the maximal effects were obtained at concentrations of fructose, sorbitol and mannose as low as 1 mM. Glucose reached its maximal effect (6.63 ± 0.09 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein) at 20 mM, although its effect at concentrations of 1 mM were also almost maximal (Fig. 3D).

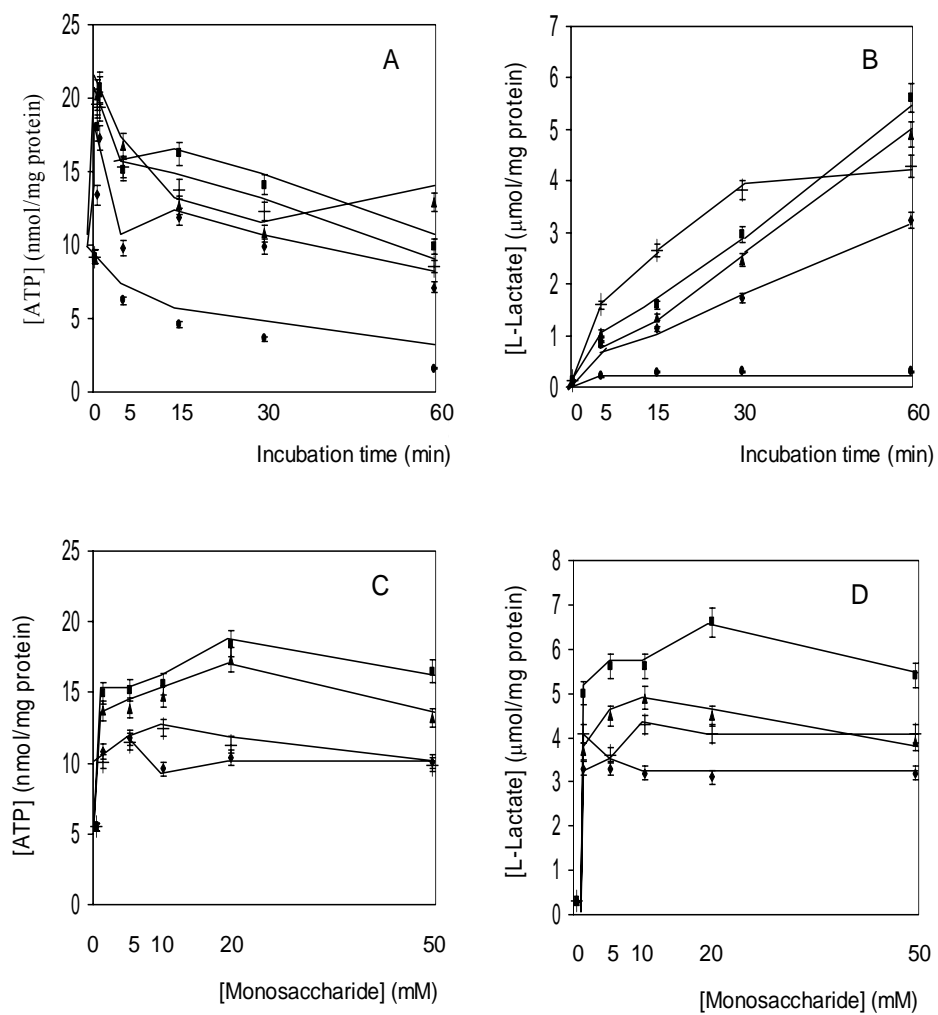


Figure 3

Figure 3. Time- and concentration-dependent effects of monosaccharides on the intracellular levels of ATP and the extracellular concentrations of L-lactate in fresh boar spermatozoa. A,C: Spermatozoa were incubated in the absence (●) or presence of 10 mM glucose (■), 10 mM fructose (▲), 10 mM mannose (◆) and 10 mM sorbitol (⊕) and, at the indicated times, aliquots were taken to determine the intracellular levels of ATP (A) and the extracellular concentrations of L-lactate (C). B,D: Spermatozoa were incubated for 15 min (B) or 60 min (D) with increasing concentrations of glucose (■), fructose (▲), mannose (◆) and sorbitol (⊕), and aliquots were taken to determine the intracellular levels of ATP (B) and the extracellular levels of L-lactate (D). Results shown are means±S.E.M. for 8 separate experiments.

3.5. Effects of glucose and fructose on CO₂ production in boar spermatozoa

The incubation of boar spermatozoa with ¹⁴C-glucose and ¹⁴C-fructose induced, in both cases, a concentration-dependent increase in ¹⁴CO₂ production, which reached maximal values at sugar concentrations of 10 mM-20 mM (Fig. 4). Sensitivity of boar cells to CO₂ production from fructose at low concentrations was greater than that from glucose, since the incubation with 5 mM ¹⁴C-fructose induced much greater CO₂ production (31.7±4.1 nmol/mg protein) than that with 5 mM ¹⁴C-glucose (16.9±2.9 nmol/mg protein, see Fig. 4). However, in both cases CO₂ production was low, especially when compared with the rate of L-lactate production from the same substrates. We were not able to determine the CO₂ formation from mannose and sorbitol since there was no availability of ¹⁴C-marked forms of both sugars.

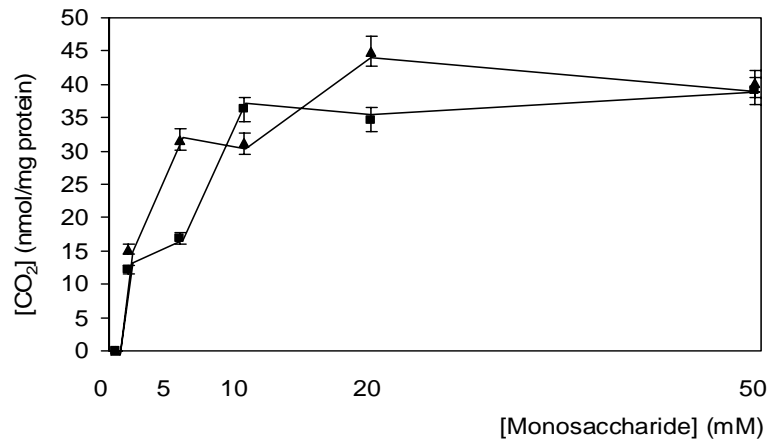


Figure 4

Figure 4. Concentration-dependent effects of glucose and fructose on the rhythm of CO₂ production. Spermatozoa were incubated for 60 min with increasing concentrations of glucose (■) or fructose (▲), and aliquots were taken to determine the extracellular formation of CO₂. Results shown are means±S.E.M. for 8 separate experiments.

3.6. Modulation of total hexokinase activity from crude boar sperm extracts by glucose, fructose, mannose and sorbitol

In a previous report (Fernández-Novell et al., 2004), we determined, after a kinetic analysis, that boar sperm had a single total hexokinase activity, with an estimated, theoretical K_m for glucose of about 0.05 mM. Since the kinetics of total hexokinase activity was carried out in this previous report, our intention now is to determine putative differences in the sensitivity of boar-sperm hexokinase activity in front of several phosphorylable monosaccharides. In this way, the total hexokinase activity of boar-sperm extracts was much more sensitive to the presence of glucose than to both fructose and mannose. As shown in Fig. 5A, total hexokinase activity from supernatants was high (1.7 ± 0.1 mIU/mg protein) at glucose concentrations as low as 0.1 mM, reaching maximal values of glucose at concentrations of 5 mM. Fructose, mannose and sorbitol showed a very similar effect, although in this case the maximal total hexokinase activity from supernatants was remarkably lower (about 1 mIU/mg protein with 50 mM of all of these sugars). An even greater difference was determined in resuspended pellets. In these conditions, total hexokinase activity was also very sensitive to glucose, observing a progressive increase in hexokinase activity from 0.1 mM glucose (3.8 ± 0.6 mIU/mg protein) to 50 mM glucose (6.7 ± 1.2 mIU/mg protein, see Fig. 5B). On the contrary, fructose only activates total hexokinase activity from resuspended pellets at concentrations above 5 mM, whereas both mannose and sorbitol were unable to induce any detectable hexokinase activity at any of the tested concentrations (Fig. 5B).

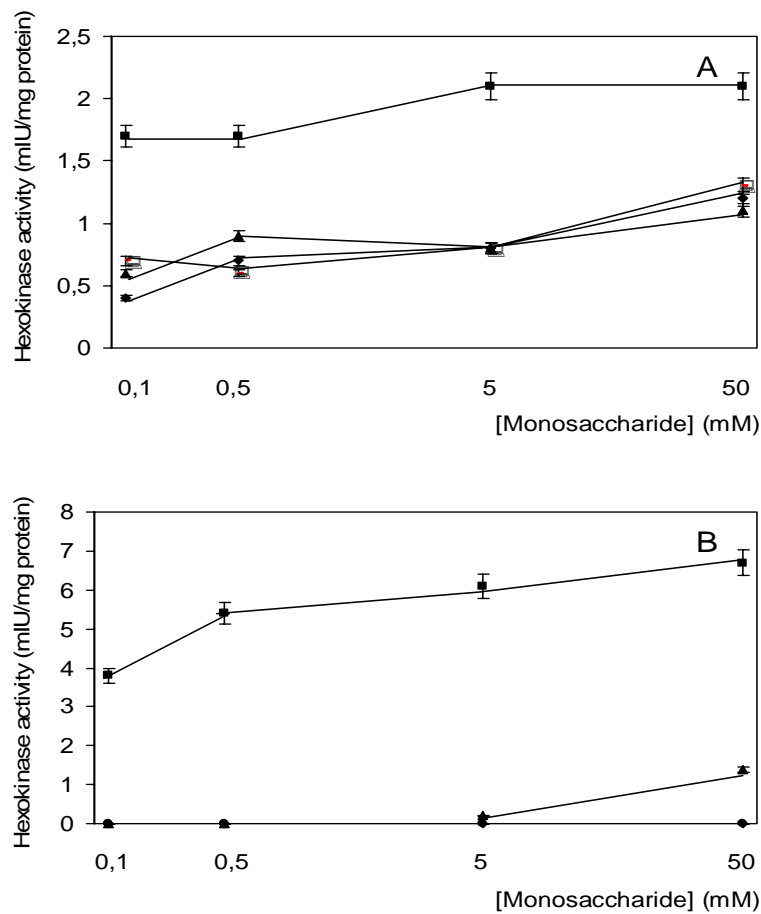


Figure 5

Figure 5. Sensitivity of glucose, fructose, mannose and sorbitol to total hexokinase activity of boar-sperm extracts. Total hexokinase activity was determined in the presence of increasing concentrations of glucose (■), fructose (▲), mannose (◆) and sorbitol (⊕) in supernatants (A) and resuspended pellets from boar-sperm extracts (B). Total hexokinase activity was determined as described in the Material and Methods section. Results shown are means±S.E.M. for 8 separate experiments.

3.7. Total pyruvate kinase activity kinetics of boar spermatozoa

Boar sperm showed the presence of an ADP-activated total PK activity, both in the supernatants and the resuspended pellets from cell extracts. Thus, total PK activity increased about 20-fold in supernatants when this was measured in the presence of 1.25 mM ADP (Fig. 6A). Furthermore, the ADP-activated PK activity was dependent on the phosphoenolpyruvate (PEP) concentrations. In this respect, there was a roughly progressive increase in PK activity from 0.05 mM PEP to 4-5 mM PEP, with a maximal activity of 126.4 ± 7.3 mIU/mg protein at 4 mM PEP (Fig. 6A). The resuspended pellets showed a much lower PK activity, which was also ADP-dependent at PEP concentrations of from 0.05 mM to 2 mM (Fig. 6B). On the contrary, PK activity at PEP concentrations above 2 mM were not greatly different with or without the presence of 1.25 mM ADP, indicating that at these concentrations of PEP there was a saturation of the PK system (Fig. 6B)

The Lineweaver-Burke representation of PK activity in both supernatants and resuspended pellets from boar-sperm extracts were compatible with the presence of a single PK activity. This activity showed an estimated, theoretical K_m of about 0.15-0.20 mM both in the presence and in the absence of ADP in supernatants (Fig. 6C). Similar results, although with a single, estimated and theoretically calculated K_m of 0.9-1 mM, were observed in resuspended pellets both in the presence and the absence of ADP (Fig. 6D), suggesting that ADP increased PK activity without a great modification of its sensitivity to PEP.

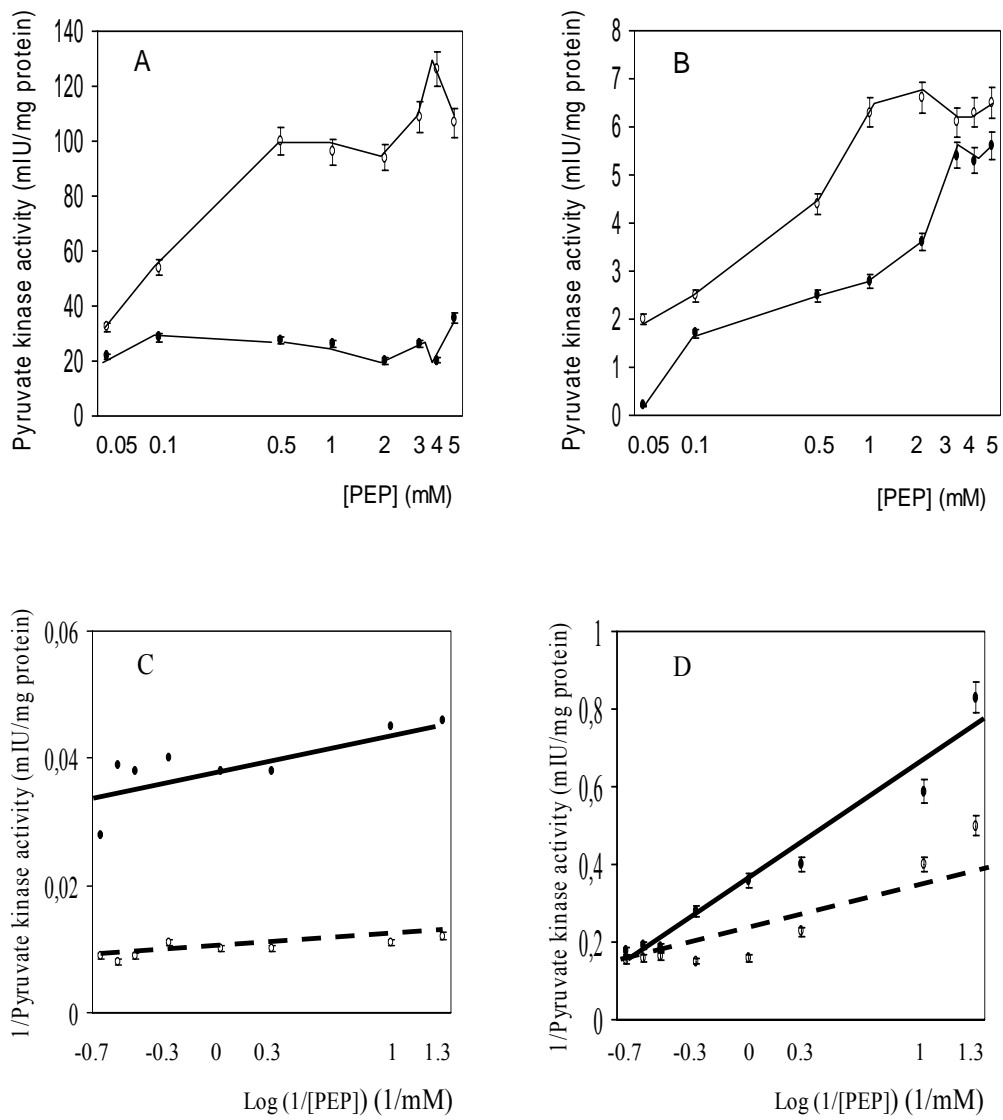


Figure 6

Figure 6. Kinetics of total pyruvate kinase activity in boar-sperm extracts. A: Relationship between total pyruvate kinase activity and phosphoenol pyruvate concentration in supernatants from boar-spermatozoa extracts. The activity has been determined in the absence (●) or in the presence of 1.25 mM ADP (○). B: Relationship between total pyruvate kinase activity and phosphoenol pyruvate concentration in resuspended pellets from boar-spermatozoa extracts. The activity has been determined in the absence (●) or in the presence of 1.25 mM ADP (○). C,D: Semi-logarithmic representation between inverse values of total pyruvate kinase activity and phosphoenol pyruvate concentrations in supernatants (C) and resuspended pellets (D) from boar-sperm extracts. Lines show the apparent pyruvate kinase activity types in the absence (● and continuous line) and the presence of 1.25 mM ADP (○ and broken lines) revealed by this representation. Total pyruvate kinase activity has been determined as described in the Material and Methods section. Results shown are means±S.E.M. for 8 separate experiments.

3.8. Localization of GLUT-3 hexose transporter and hexokinase-I in boar spermatozoa

Western blot analysis utilizing an anti-GLUT-3 antibody showed the presence of a specific, approximately 45 Kda band in sperm extracts, which was similar to that detected in dog sperm and published before (Fig. 7A, and Rigau et al., 2002). This band is compatible with the presence of GLUT-3 in boar sperm. Immunogold electron microscope analysis also showed the presence of proteins reactive against the GLUT-3 antibody in both the head and the midpiece of the sperm. The GLUT-3 signal was not abundant, and it could be localized at the external and internal cytoplasmic membrane of the head as well as the membrane structures of the midpiece outwards the mitochondrial sheath (Figs. 7C and 7D). It is noteworthy that the GLUT-3 signal could also be localized in membrane fragments that were separated from the sperm as a consequence of cellular fixation and processing for immunogold (data not shown). Furthermore, the GLUT-3 signal was more frequently detected as clusters of gold particles rather than as single, isolated marks, specially in the head (Figs. 7C and 7D).

Western blot against hexokinase-I also showed the presence of two majority, specific bands in both dog and boar sperm, which were compatible to that determined in rat liver (Fig. 8A). Moreover, the size of these bands matched the data published elsewhere (Cárdenas et al., 1998), indicating that boar sperm has a protein compatible with hexokinase-I.

Immunogold localization of hexokinase-I showed a scarce presence of positive reaction, which was mainly associated with both the external cytoplasmic membrane and the sub-membraneous spaces of the head, whereas even more scarce, single signals were localized at the midpiece outside of the mitochondrial sheath (Figs. 8B and C).

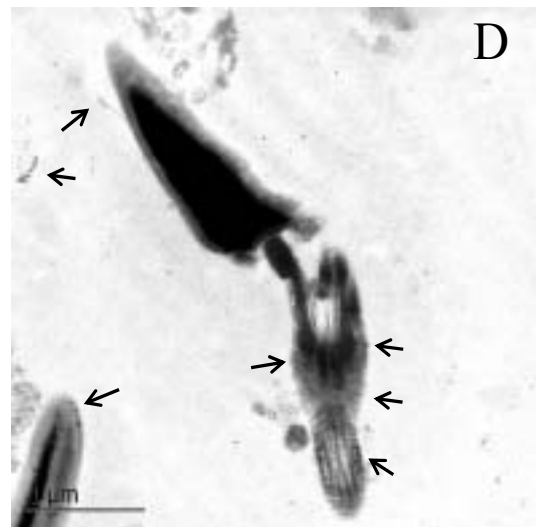
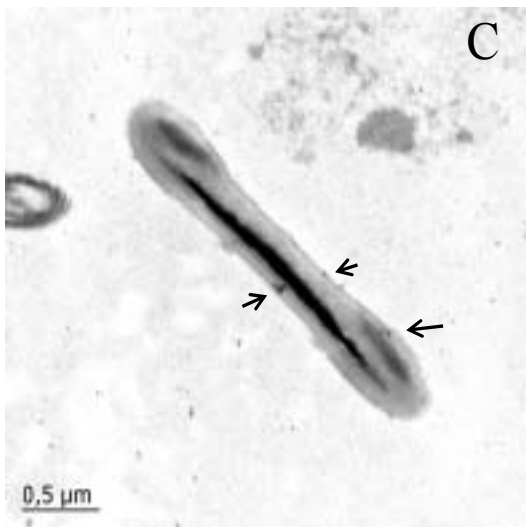
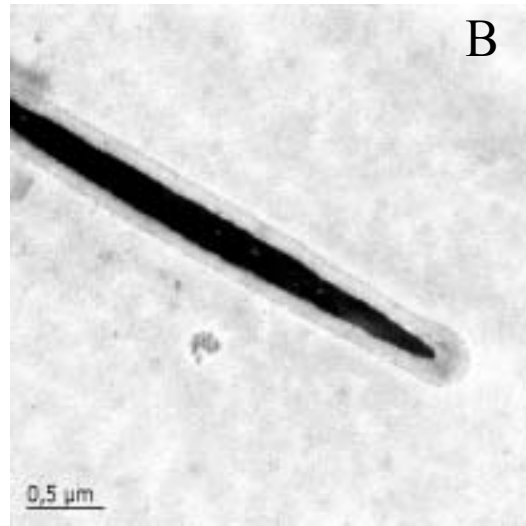
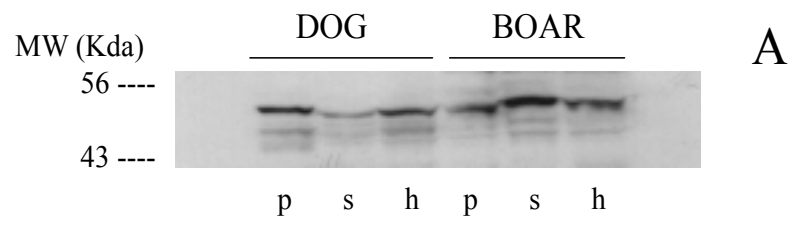


Figure 7

Figure 7. Expression and location of GLUT-3 hexose transporter in boar spermatozoa. A: Western blot against GLUT-3 in boar spermatozoa extracts. The Figure shows a representative Western blot obtained from supernatants (s), resuspended pellets (p) and total extracts (h) from dog (DOG) and boar (BOAR) homogenates obtained from fresh samples. MW: Molecular weights. The total number of independent replicates for this Western blot was 5. C-D: Immunogold localization of GLUT-3 in boar spermatozoa. The immunogold technique has been described in the Material and Methods section. Arrows indicate the presence of a positive reaction against the anti-GLUT-3 antibody. Bars indicate the size of the image. B: A representative, negative control for the immunogold technique for all of the showed proteins.

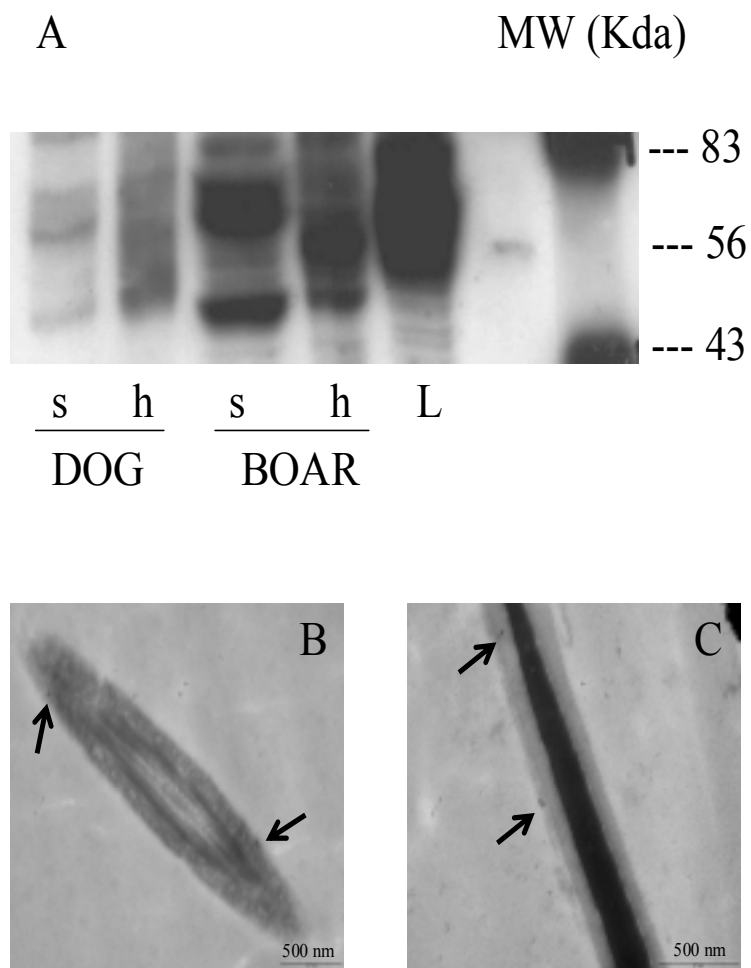


Figure 8

Figure 8. Expression and location of hexokinase-I in boar spermatozoa. A: Western blot against hexokinase-I in boar spermatozoa extracts. The Figure shows a representative Western blot obtained from supernatants (s), resuspended pellets (p) and total extracts (h) from dog (DOG) and boar (BOAR) homogenates obtained from fresh samples. L: Rat-liver homogenate. MW: Molecular weights. The total number of independent replicates for this Western blot was 5. C-D: Immunogold localization of hexokinase-I in boar spermatozoa. The immunogold technique has been described in the Material and Methods section. Arrows indicate the presence of a positive reaction against the anti-hexokinase-I antibody. Bars indicate the size of the image.

3.9. Effects of Incubation with monosaccharides in the Tyrosine-Phosphorylation Pattern of boar sperm extracts

As shown in Fig. 10, the Tyr-Phos pattern of whole-boar extracts shows a specific pattern, with a major band at about 45 Kda. Incubation with all of the sugars at a concentration of 10 mM did not have a clear effect, neither in the intensity nor in the distribution of the bands of this pattern, and only in some experiments could a slight increase in the intensity of the 45-Kda band be observed (Fig 9 and data not shown).

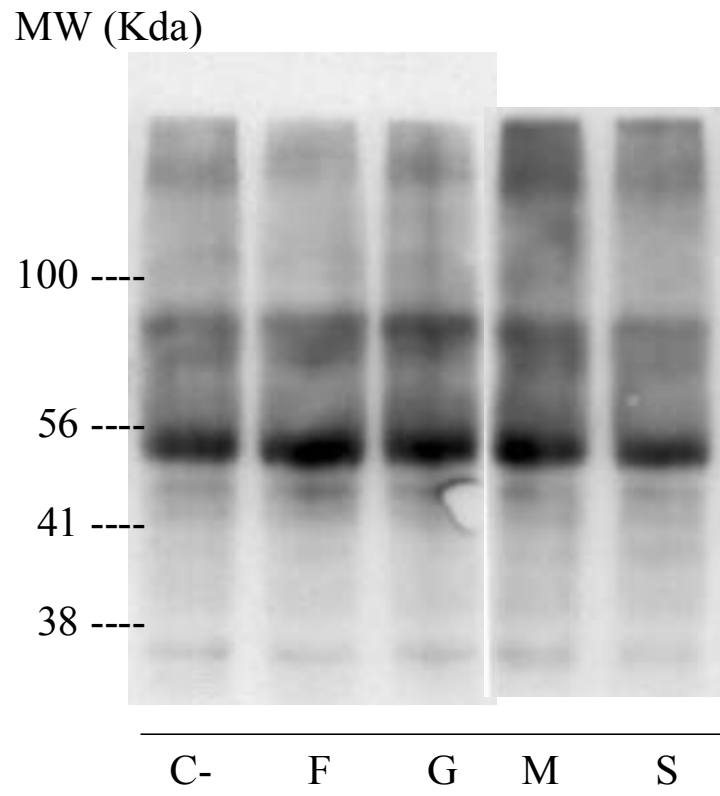


Figure 9

Figure 9. Tyrosine phosphorylation pattern of boar spermatozoa incubated with 10 mM glucose or 10 mM fructose. Aliquots were collected at the indicated times to determine the tyrosine-phosphorylation pattern after a Western blot analysis against an anti-mouse phosphorylated tyrosine antibody. The amount of total protein analyzed in each lane was 30 μ g. The Figure shows a representative Western blot from 5 independent replicates. C-: Samples incubated for 10 min without energy substrates. G: Cells incubated for 10 min with 10 mM glucose. F: Sperm incubated for 10 min with 10 mM fructose. M: Cells incubated for 10 min in the presence of 10 mM mannose. S: Boar sperm incubated for 10 min in the presence of 10 mM sorbitol. MW: Molecular weights. The total number of independent replicates for this experiment was 5.

4. DISCUSSION

Our results clearly indicate that the differences observed in the utilization of glucose, fructose, mannose and sorbitol through glycolysis in boar sperm has its primary basis in separate rhythms of phosphorylation of these monosaccharides by the cells. In fact, there was a close relationship between the sensitivity of phosphorylation and extracellular L-lactate formation. In this sense, whereas glucose was the most lactatogenic of all of the tested sugars, its sensitivity to phosphorylation through hexokinase activity was also the greatest. On the other hand, sorbitol, which is utilized through a way which does not utilize hexokinase activity as its first step (Newsholme and Leech, 1983), also induced the lowest lactatogenic rhythm. The case of fructose is noteworthy. At this point, our results agree with those of Jones and Connor (2000), who indicates that boar sperm utilizes fructose less efficiently than glucose. This is due to two separate factors: First, the lower sensitivity of fructose to hexokinase when compared to glucose, as stated. Second, the lack of an alternative pathway to enter into glycolysis, catalyzed by a specific fructokinase activity. This fructokinase activity has been reported in the liver, and it is characterized by the phosphorylation of fructose to fructose 1-phosphate instead of to fructose 6-phosphate (Lehninger et al., 1993). Unpublished results from our laboratory indicate that boar sperm has no significant levels of fructokinase activity, and, in this manner, the only way that fructose can utilize to enter into glycolysis is by passing through the hexokinase-mediated phosphorylation. These results would agree with others concerning other species, like dog, where phosphorylation of fructose rendered hexoses 6-P instead of fructose 1-phosphate (Rigau et al., 2002), thus indicating the same lack of fructokinase activity. Summing up all of these results, we can conclude that the rate of phosphorylation through the hexokinase activity controls the boar sperm's ability to utilize

monosaccharides. Focusing on the exact type of hexokinase that is present in boar sperm, the presence of a positive signal against an anti-hexokinase-I antibody could indicate that this type of hexokinase would be present here. Previous reports have shown that boar sperm has single hexokinase kinetics, with a very low K_m for glucose, about 0.05 mM (Fernández-Novell et al., 2004). This kinetics is similar to that reported for the hexokinase-I type (Cárdenas et al., 1998). Thus, the sum of kinetic and immunologic data indicates that at least the main hexokinase activity found in boar sperm can be related to hexokinase-I or another enzyme closely related to it.

Notwithstanding the importance of the hexokinase step in the control of boar-sperm glycolysis, it becomes evident that this metabolic pathway is also controlled by the modulation of, at least, another key enzyme step, as PK is. Boar-sperm total PK activity shows two remarkable aspects. The first is the great sensitivity to the substrates, since near-maximal activity was achieved at low concentrations of PEP. The second is the ADP-dependent activation of the sperm isozyme. This ADP-linked activation is not uncommon and, for instance, the liver isozyme of PK shows the same characteristic (Feliu et al., 1977), thus suggesting that the sperm isozyme could be similar to the hepatic one. In any case, the sum of both characteristics indicates that the final step of glycolysis in boar sperm is closely dependent on the ADP/ATP intracellular ratio, and, in this way, a drop in the intracellular levels of ATP would concomitantly induce an increase in ADP, which, in turn, would activate the glycolytic rhythm, hence increasing the new formation of ATP. When the ATP levels regained high levels, this would induce a lowering in ADP with the concomitant decrease on the glycolytic rhythm. This lowering, together with an ATP-dependent increase in the ATP consumption linked to mechanisms like motility, will induce the already-observed substrate cycling, typical of mammalian sperm (Hammersted and Lardy, 1983). Nevertheless, the fast and

automatic, ATP/ADP-linked feedback of PK activity allows for the maintenance of this substrate cycling at non-dangerous levels for sperm function, despite the fact that mammalian spermatozoa rarely achieve the theoretical stoichiometric ATP yield (Hammersted and Lardy, 1983). Thus, the combination of a very high rhythm of glycolysis induced by the great sensitivity to hexokinase and PK to their respective substrates, together with the ATP/ADP ratio-dependence of PK activity and the tendency to the establishment of a substrate cycling, implies that boar sperm has a very rapid and very sensitive system to control and adjust its energy requirements depending on the quantitative (total amount of extracellular energy substrates) and qualitative (specific type of extracellular energy substrates) changes in the energy environment that surrounds the cell.

Immunogold results yielded some interesting considerations in order to have a better understanding of regulatory mechanisms of hexose utilization by boar sperm. Firstly, it is noteworthy that, at least GLUT-3 can be located in both the internal and the external cellular membranes of the head. This is striking, since only those transporters that were located externally would contact, and hence uptake, glucose into the cell. A possible explanation could be that both internal and external GLUT-3 transporters could represent separate functional forms for this protein. In this respect, it has been demonstrated that hexose transporters GLUT-3 and GLUT-1 are localized in caveolin domains, and hence co-localize with caveolin-1 in rat spermatocytes and spermatids (Rauch et al., 2005). Caveolin-1 actively participates in the formation of caveolae during phenomena such as endocytosis (Montesano, 1982). Following this, the presence of internalized GLUT-3 could be a consequence of a caveolin-linked transposition to the internal cellular membrane of this transporter following the union with glucose. This transposition could be caused by an endocytosis-like process, which would involve the

formation of caveolin-1-associated caveolae which would contain GLUT-3 transporters linked to glucose molecules. In this way, GLUT-3 associated with the external membrane would be those proteins not associated with hexoses, whereas those located internally would be linked to monosaccharides. The transposition of membrane receptors from the cellular membrane to inside the cell through a caveolae-related mechanism is not rare and, for instance, the activation of the GLUT-4 glucose transporter in adipocytes seems to follow this mechanism (Goldberg et al., 1987). There is no report about a similar phenomenon linked to GLUT-3 in any other cell type. However, since the membrane structure of sperm is very different from the other eucaryotic cells, specially in the head region, a functional specialization of this type, already accomplished in other cells for other glucose transporters like the above-mentioned GLUT-4 (Goldberg et al., 1987), could not be dismissed in order to optimize the rhythm of hexose intake by boar sperm.

Another striking feature observed in the immunogold results was that GLUT-3 had a tendency to show a reaction against their respective specific antibody which resulted in the accumulation of gold particles rather than in the appearance of single, isolated gold marks. This seems to suggest that these hexose transporters are located in the sperm cell membrane forming aggregates more than as single, isolated molecules. This would be linked to the observed results on hexokinase-I, which seems to also be distributed in a non-uniform, concrete manner. The aggregates formation could suggest a specific zonation of hexose metabolism, since the uptake of monosaccharides would be produced only at concrete, specific points of the sperm surface where the transporters were specifically located. In this regard, results involving a close relationship between glucose transporters and proteins such as caveolin-1 in sperm-generating cells, as those already mentioned (Rauch et al., 2005), are of the greatest interest. An important feature

of caveolin-1 is that this protein marks the presence in the membrane of concrete, specific caveolae dominions characterized by a very high cholesterol content when compared with the rest of the cellular membrane (Smart, 1996). These caveolin-1-related dominions have been related to the regulation of very different aspects of the cell-membrane function, such as signal transduction (Lisanti, et al., 1994), modulation of calcium uptake (Fujimoto, 1993), and processes of receptor-mediated uptake including endocytosis, clatrin-independent transcytosis and potocytosis (Montesano et al., 1982; Milici et al., 1987; Tran et al., 1987; Anderson, 1993). In this regard, we can reasonably suppose that hexose metabolism in mammalian spermatozoa would be fractionated in separate, specific ways, depending on the association of the uptake points of these hexoses, represented by the separate hexose transporters, with proteins like caveolin-1 and others. At this moment, we are performing experiments based on the co-localization of proteins as well as the utilization of metabolic inhibitors in order to test this hypothesis. However, the possibility of separate pathways directed to obtaining energy for specific, separate functions in mammalian sperm would explain the great complexity of the energy metabolism management observed in these cells when placed in very different environmental conditions.

Incubation with the different sugars did not modify the specific pattern of Tyr-Phos in boar spermatozoa determined after a Western blot. This is different from that observed in other species, like dog, where glucose and fructose induced not only a noticeable increase in the intensity of Tyr-Phos bands, but also the appearance of some specific phosphorylated bands (Rigau et al., 2002). This result indicates that the role of specific functional modulators that monosaccharides have in species such as dog is not greatly developed in boar, since this sugar-specific modulation would induce specific changes in the Tyr-Phos pattern. Of course, this result does not completely invalidate a role as

specific-functional modulators for glucose and fructose, for instance, since these sugars could act by modifying, for instance the phosphorylation state of single proteins that are very difficult to detect by a single Western blot. However, since these specific changes are much easier to detect in dog, it is reasonable to suppose that the specific modulation effect of sugars is more important in species like dog than in boar. These differences among mammals, as well as those already determined in aspects such as the general management of energy metabolism in species like dog, boar, bull and mouse (Rikmenspoel and Caputo, 1966; Hammersted and Lardy, 1983; Jones and Connor, 2000; Rigau et al.; 2002; Marín et al., 2003), clearly indicate that mammalian sperm cannot be considered as a homogeneous group, at least under the functional point of view. It is evident that each mammalian species has a specific, separate functional design of its sperm, certainly related to the very different evolutionary strategies that each species has developed to achieve “in vivo” fertilization. In this way, the functional characteristics of the spermatozoa in species as dog, which has to maintain their spermatozoa inside the female genital tract for long periods (Feldman and Nelson, 1987), are very different from others like boar, with a shorter lifespan (Hunter, 1982). In conclusion, the differential use of monosaccharides by boar spermatozoa is primarily based on the different sensitivity that these sugars have to hexokinase activity. Thus, the uptake and phosphorylation of sugars is the first key step in the regulation of hexose metabolism. The second, important key step is modulated by PK activity, which acts depending on the ATP/ADP intracellular ratio. This implies that the metabolic rate of boar sperm is regulated, first by the specific sugar that the cells find in the environment and, second, by the specific intracellular energy levels. Finally, our results suggest that glycolysis is initiated only at some concrete points of the cell, depending on the specific hexose transporter and the relationship of this transporter to other function-

modulatory molecules, like caveolin-1. In this way, the final obtainment and utilization of the energy would vary depending on the specific way of uptake utilized by boar spermatozoa. All of this has to be taken into consideration when designing new systems of sperm storage and conservation, since only careful knowledge of the specific function characteristics of the cells will allow an optimal result.

5. ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Mr. Chuck Simmons for his valuable assistance in preparing the English version of the manuscript and to Mercè Martí and Francisca Cardoso from the “Servei de Microscopia Electrònica” (Autonomous University of Barcelona) for their most helpful guidance in the performance of the immunogold technique. This work has been supported by Grant AGL2001-2568 from the Ministry of Science and Technology, Spain.

6. REFERENCES

- Albarracín JL, Fernández-Novell JM, Ballester J, Rauch MC, Quintero-Moreno A, Peña A, Mogas T, Rigau T, Yáñez A, Guinovart JJ, Slebe JC, Concha II and Rodríguez-Gil JE. 2004. Gluconeogenesis-linked glycogen metabolism is important in the achievement of in vitro capacitation of dog spermatozoa in a medium without glucose. *Biol. Reprod.* 71: 1437-1445.
- Anderson RGW. 1993. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10909-10913.
- Ballester J, Fernández-Novell JM, Rutllant J, García-Rocha M, Palomo MJ, Mogas T, Peña A, Rigau T, Guinovart JJ and Rodríguez-Gil JE. 2000. Evidence for a

- functional glycogen metabolism in mature mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Develop* 56: 207-219.
- Bamba K. 1988. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology* 29: 1245-1251.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Burnett WN. 1981. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated proteins. *J Anal Biochem* 112:195-203.
- Cárdenas ML, Cornish-Bowden A, Ureta T. 1998. Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim Biophys Acta* 1401:242-264.
- Dykstra MJ. 1992. Staining Methods for Semithins and Ultrathins. In: Dykstra, MJ, ed *Biological Electron Microscopy. Theory, Techniques, and Troubleshooting*. New York: Plenum Press. 175-180.
- Feldman EC and Nelson RW. 1987. Fertilization . In: Pedersen E, ed. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. Philadelphia: WB Saunders Co. 420-421.
- Feliu JE, Hue L and Hers HG. 1977. Regulation in vitro and in vivo of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent inactivation of rat liver pyruvate kinase type L. *Eur J Biochem* 81: 609-617
- Fernández-Novell JM, Ballester J, Medrano A, Otaegui PJ, Rigau T, Guinovart JJ and Rodríguez-Gil JE. 2004. The presence of a high-Km hexokinase activity in dog, but not in boar, sperm. *FEBS Lett* 570: 211-216.
- Folgero T, Bertheussen K, Lindal S, Torbergsen T and Oian P. 1993. Mitochondrial disease and reduced sperm motility. *Human Reprod* 8: 1863-1868.

- Fraser LR and Herod JE. 1990. Expression of capacitation-dependent changes in chlorotetracycline fluorescence patterns in mouse spermatozoa requires a suitable glycosylable substrate. *J Reprod Fertil* 88: 611-621.
- Fujimoto T. 1993. Calcium pump of the plasma membrane is located in caveolae. *J Cell Biol* 120: 1147-1157.
- Goldberg RI, Smith RM and Jarett L. 1987. Insulin and alpha-2-macroglobulin-methylamine undergo endocytosis by different mechanisms in rat adipocytes. I: comparison of cell surface events. *J Cell Physiol* 133: 203-212.
- Halangk W, Bohnenback R and Kunz W. 1985. Interdependence of mitochondrial ATP production and extramitochondrial ATP utilization in intact spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 808: 316-322.
- Hammersted RH and Lardy HA. 1983. The effects of substrate cycling on the ATP yield of sperm glycolysis. *J Biol Chem* 258: 8759-8768.
- Hunter RHF. 1982. Interrelationships between spermatozoa, the female reproductive tract and the eggs investments. In: Cole DJA and Foxcroft GR, eds. *Control of Pig Reproduction*. London, Butterworth Scientific, 49-64.
- Jones AR, Chantrill LA, Cokinakis A. 1992. Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa. *J Reprod Fertil* 94:129-134.
- Jones AR. 1997. Metabolism of lactate by mature boar spermatozoa. *Reprod Fertil Develop* 9:227-232.
- Jones AR, Connor DE. 2000. Fructose metabolism by mature boar spermatozoa. *Reprod Fertil Develop* 12:355-359.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

- Lambrecht M and Transtschold D. 1984. ATP determination with hexokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie. p 543-551.
- Lehninger AL, Nelson DL and Cox MM. 1993. Feeder pathways of glycolysis. In: Lehninger AL, Nelson DL and Cox MM, eds. *Principles of Biochemistry*, 2^d Edition. New York, Worth Publishers, 422-423.
- Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, Cook RF and Sargiacomo M. 1994. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol* 126: 111-126.
- Marín S, Chiang K, Bassilian S, Lee W-N P, Boros LG, Fernández-Novell JM, Centelles JJ, Medrano A, Rodríguez-Gil JE, Cascante M. 2003. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Lett* 554:342-346.
- Michal G. 1984. Glucose 6-phosphate. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie. p 191-197.
- Milici AJ, Watrous NE, Stukenbrok H and Palade GE. 1987. Transcytosis of albumin in capillary endothelium. *J Cell Biol* 105: 2603-2612.
- Montesano R, Roth J, Robert A and Orci L. 1982. Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. *Nature* 296: 651-653.
- Mukai C and Okuno M. 2004. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod* 71: 540-547.
- Newsholme EA and Leech AR. 1983. Sorbitol. In: Newsholme EA and Leech AR, eds. *Biochemistry for the Medical Sciences*. Chciester, John Wiley & sons, 470-471.

- Noll, F. 1984. L-lactate. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie. p 582-588.
- Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. 2004. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology* 61:673-690.
- Rauch MC, Ocampo ME, Bohle J, Amthauer R, Yáñez A, Rodríguez-Gil JE, Slebe JC, Reyes JG and Concha II. 2005. Hexose transporters GLUT1 and GLUT3 are colocalized with hexokinase I in caveolae microdomains of rat spermatogenic cells. Submitted.
- Rawn JD. 1983. Hexokinase. In: Rawn JD, ed. *Biochemistry*. New York, Harper & Row Publishers Inc, 557-558.
- Rigau T, Rivera M, Palomo MJ, Fernández-Novell JM, Mogas T, Ballester J, Peña A, Otaegui PJ, Guinovart JJ, Rodríguez-Gil JE. 2002. Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. *Reproduction* 123:579-591.
- Rikmenspoel R and Caputo R. 1966. The Michaelis-Menten constant for fructose and glucose of hexokinase in bull spermatozoa. *J Reprod Fertil* 12: 437-444.
- Rogers BJ and Perreault SD. 1990. Importance of glycosylable substrates for in vitro capacitation of human spermatozoa. *Biol Reprod* 43: 1064-1069.
- Ruíz-Pesini E, Díez C, Lapena AC, Pérez-Martos A, Montoya J, Álvarez E, Arenas J and López-Pérez M. 1998. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clin Chem* 44: 1616-1620.
- Smart EJ, Ying Y, Donzell WC and Anderson RGW. 1996. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* 271: 29427-29435.

Tran D, Carpentier JL, Sawano F, Gorden P and Orci L. 1987. Ligands internalized through coated or noncoated invaginations follow a common intracellular pathway. Proc Natl Acad Sci USA 84: 7957-7961.

CAPÍTULO III

TEXTO EN ESPAÑOL

LA UTILIZACIÓN ESPECÍFICA DE LOS MONOSACÁRIDOS A TRAVÉS DE LA GLUCÓLISIS ES REGULADA A TRAVÉS DE LA MODULACIÓN DE LAS ACTIVIDADES HEXOQUINASA Y PIRUVATO QUINASA EN ESPERMATOZOIDES DE CERDO PROVENIENTES DE EYACULADOS FRESCOS.

Antonio Medrano¹, Núria García-Gil², Laura Ramió¹, Josep M^a Fernández-Novell³
Alejandro Peña¹, Elisabeth Pinart², Ilona I. Concha⁴, Sergi Bonet², Teresa Rigau¹ and
Joan E. Rodríguez-Gil^{1*}

¹Unidad de Reproducción Animal, Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, España.

²Unidad de Biotecnología de la Rreproducción Porcina, Universidad de Girona, Campus de Montilivi, s/n, 17071 Girona, España.

³Departamento de Bioquímica i Biología Molecular y IRBB, Parc Científic de Barcelona, Universidad de Barcelona, 08028 Barcelona, España.

⁴Instituto de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Campus Isla Teja, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

*Autor corresponsal

Dirección de correspondencia: Joan E. Rodríguez-Gil. Unidad de Reproducción Animal. Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. E-08193 Bellaterra, España.

E-mail:juanenrique.rodriguez@uab.es

Palabras claves: espermatozoide de cerdo, glucólisis, monosacáridos, hexoquinasa, piruvato quinasa.

Título resumido: Regulación de la utilización específica de monosacáridos por espermatozoides de cerdo

To be submitted

RESUMEN

La incubación de espermatozoides de cerdo en un medio isotónico con 10 mM de Glucosa indujo una rápida e intensa activación de la glucólisis, tal y como indicaron los aumentos observados en los niveles intracelulares de G 6-P y ATP y el ritmo de formación extracelular de L-lactato. El efecto de la glucosa fue mucho más intenso que el inducido por otros monosacáridos, como la fructosa, el sorbitol y la manosa. En este sentido, la concentración extracelular de L-lactato alcanzó valores de $5,61 \pm 0,05 \mu\text{mol/mg}$ de proteína tras 60 minutos de incubación con 10 mM de glucosa, mientras que la incubación con 10mM de fructosa, manosa o sorbitol durante 60 minutos indujo niveles de lactato por debajo de tan sólo $5 \mu\text{mol/mg}$ de proteína en todos los casos. El elevado ritmo de transformación de la glucosa se relacionó una afinidad mayor de la actividad hexoquinasa por este azúcar en comparación con los otros monosacáridos. Así, mientras que la presencia de 0,5mM de glucosa indujo una actividad hexoquinasa total en sobrenadantes de extractos espermáticos de $1,7 \pm 0,1 \text{ mIU/mg}$ de proteína, la misma concentración de fructosa y manosa indujeron una actividad de hexoquinasa total de sólo $0,3 \pm 0,1 \text{ mIU/mg}$ de proteína y $0,6 \pm 0,1 \text{ mIU/mg}$ de proteína, respectivamente. Además, las diferencias en la activación de la hexoquinasa total fueron incluso mayores en sedimentos resuspendidos de extractos espermáticos. Por otro lado, el análisis cinético de la actividad piruvato quinasa mostró una actividad muy dependiente de la presencia de ADP, así como una gran afinidad por el fosfoenol piruvato, con una K_m teórica estimada en los sobrenadantes homogenizados de 0,15-0,20mM. La inmunolocalización de proteínas mediante la técnica del inmunogold mostró una estrecha relación entre proteínas claves de la glucólisis, como el transportador de hexosas GLUT-3 y la hexoquinasa-I. Además, la los resultados obtenidos con esta

técnica también indican que estas proteínas muestran una tendencia a distribuirse alrededor de la membrana celular de la cabeza y la pieza intermedia de manera agrupada. Finalmente, los monosacáridos no indujeron ningún cambio específico en el patrón de fosforilación global de proteínas en residuos de Tirosina, sugiriendo que la metabolización de los monosacáridos no tenía un efecto específico en este punto en concreto de la funcionalidad del espermatozoide de cerdo. Estos datos, junto a otros publicados anteriormente por otros autores, muestran que el primer punto de control en la utilización específica de monosacáridos por los espermatozoides de cerdo es la modulación de la actividad hexoquinasa, mientras que la actividad piruvato quinasa es el segundo punto importante de control de la glucólisis. De esta manera, la glucólisis parece estar regulada por tanto la disponibilidad de un azúcar concreto como por el equilibrio interno entre los niveles de ATP y ADP. Además, la localización de las proteínas que controlan la captación de glucosa y su fosforilación sugiere que la glucólisis solo se inicia en puntos concretos ligados a la superficie del espermatozoide de cerdo.

1. INTRODUCCION.

En los últimos años, se ha publicado una cantidad creciente de información sobre los mecanismos mediante los cuales el espermatozoide de cerdo controla sus niveles de energía. Esta información es de capital importancia para entender los mecanismos subyacentes a la habilidad del espermatozoide de cerdo para sobrevivir y adaptarse a condiciones ambientales que a menudo son muy agresivas con el espermatozoide. Es mas, el espermatozoide tiene que adaptarse rápidamente a cambios bruscos de las condiciones ambientales, puesto que esta capacidad de adaptación es clave en procesos tales como su paso a través del tracto genital de la hembra de la cervix al oviducto. Por

otra parte, y desde un punto de vista práctico, la información sobre los mecanismos de utilización de la energía es también muy importante a la hora de optimizar la conservación, tanto de semen refrigerado como congelado. Este conocimiento podría tener una gran repercusión en la mejora de la aplicación de la inseminación artificial (IA) a nivel mundial, con la mejora consiguiente en la producción porcina. Todo esto explica la importancia que esta detrás del estudio de este aspecto concreto de la funcionalidad del espermatozoide de cerdo.

El espermatozoide de cerdo proveniente de eyaculados frescos tiene la habilidad de utilizar una amplia variedad de sustratos para obtener energía. Algunos no son monosacáridos, como el lactato (Jones, 1997), el piruvato (Jones, 1997), el glicerol o el glicerol 3-fosfato (Jones et al, 1992). Sin embargo, los monosacáridos parecen ser la fuente principal de energía. Así, el espermatozoide de cerdo tiene la habilidad de metabolizar con alta eficiencia los azúcares presentes en el plasma seminal, tal y como la glucosa (Jones y connor, 2000; Marín et al., 2003) o la fructosa (Jones y Connor, 2000). La vía principal que el espermatozoide de cerdo utiliza para metabolizar estos azúcares es la glucólisis, puesto que la energía obtenida a través de la metabolización de monosacáridos como la glucosa a través de otras vías como el ciclo de Krebs solo es alrededor de un 5% del total de energía producida por este azúcar (Marín et al., 2003). Este resultado concuerda con el hecho que la glucólisis juega el papel principal en el suministro de ATP destinado al movimiento (Mukai y Okuno, 2004), a pesar del punto de vista tradicional que indica que el ciclo de Krebs y la actividad mitocondrial y no la glucólisis mantienen la motilidad. Por otro lado, la utilización de azúcares a través de otras vías metabólicas alternativas en el espermatozoide de cerdo esta en discusión. Así, mientras que algunos autores no han encontrado la presencia de ninguna de estas vías, tal y como la glucogénesis utilizada como mecanismo de reserva energética, (Mukai y

Okuno, 2004), otros trabajos detectaron la presencia de dicho mecanismo de reserva energética en diversas especies, entre ellas la porcina (Ballester et al., 2000). Igualmente, mientras que la teoría generalmente aceptada, así como los datos publicados, indican que el espermatozoide de cerdo carece de una vía gluconeogénica funcional (Marín et al., 2003), algunos autores teorizan que esta vía puede estar activa en espermatozoides de verraco, en similitud a lo observado en otras especies, como el perro, en la cual se observa la presencia de una gluconeogénesis funcional e importante para completar la capacitación “in vitro” en un medio sin azúcares (Albarracín et al., 2004); Mukai y Okuno, 2004). Todas estas discrepancias resaltan la falta de suficientes estudios que permitan la exposición de una hipótesis unificada que explique los mecanismos regulatorios ligados al metabolismo energético en el espermatozoide de cerdo.

Uno de los puntos más intrigantes respecto al metabolismo energético del espermatozoide de cerdo es la diferente capacidad que presentan estas células para utilizar monosacáridos asimismo diferentes. Así, la bibliografía indica que el espermatozoide de cerdo utiliza de una manera más eficiente la glucosa que la fructosa, tal y como indica un incremento en el ritmo de síntesis de ATP (Jones y Connor, 2000). Esto reviste gran importancia ya que la glucosa y la fructosa no son utilizadas sólo como mero sustrato energético, si no que también son utilizados como moduladores funcionales específicos, al menos en algunas especies. En relación con este punto, se ha descrito que el porcentaje de fecundación “in vitro” de espermatozoides de ratón es mucho mayor en un medio presencia de glucosa que con concentraciones iguales de fructosa o manosa (Roger y Perreault, 1990). Este resultado parece relacionarse con la existencia de cambios específicos en la membrana plasmática dependientes de glucosa que ocurren durante la capacitación “in vitro” y la penetración (Fraser y Herod, 1990).

Por otro lado, la incubación con glucosa y fructosa indujo cambios específicos en el patrón de fosforilación en residuos de tirosina (Tyr-Phos) de espermatozoides de perro de eyaculados frescos (Rigau et al., 2002), indicando que ambos azúcares actúan de manera distinta y específica sobre la funcionalidad global de estas células. Todos estos datos indican que un conocimiento preciso de de las vías específicas de utilización de los diferentes monosacáridos pueden ser de máxima importancia para entender los mecanismos que controlan la funcionalidad “in vivo” del espermatozoide de cerdo

El objetivo principal de este trabajo fue el de establecer los mecanismos mediante los que los espermatozoides de cerdo de eyaculados frescos utilizan de manera específica y diferencial cuatro monosacáridos distintos: la glucosa, la fructosa y la manosa, que entran al metabolismo energético a través de fosforilación directa mediante la actividad hexoquinasa (Rawn, 1983; Lehninger et al., 1993), y el sorbitol, que entra en la glucólisis a través de su transformación previa en fructosa y la subsiguiente fosforilación a fructosa 6-fosfato modulada por la hexoquinasa (Newsholme and Leech, 1983). Para ello hemos analizado el efecto inducido por la incubación de células espermáticas con dichos azúcares en los niveles intracelulares de glucosa 6-fosfato (G 6-P), así como de glucógeno y ATP. Además, también se ha determinado el ritmo de formación de L-lactato y de CO₂ extracelulares, con la finalidad de analizar posibles diferencias en el paso a través de la glucólisis y el ciclo de Krebs de los diferentes azúcares. Además, con el fin de ampliar el conocimiento de los mecanismos de control en la utilización de azúcares, se determinó la actividad hexoquinasa total de extractos espermáticos de cerdo en presencia de los diferentes azúcares, así como la cinética de la actividad piruvato quinasa total (PK). Finalmente, la localización espacial de algunas proteínas estrechamente relacionadas con el metabolismo de las hexosas, como el transportador de hexosas GLUT-3 y la hexoquinasa-I, fue también analizada, así como

la respuesta del patrón Tyr-Phos frente a la incubación con azúcares. El análisis global de los resultados indica que los espermatozoides de cerdo fosforilan a través de la hexoquinasa mucho más eficientemente la glucosa que el resto de monosacáridos, entrando por lo tanto la glucosa en la glucólisis de manera mucho más rápida y eficiente que los otros azúcares. El otro punto clave en la regulación de la glucólisis en el espermatozoide de cerdo es la actividad PK que muestra ser muy dependiente de la relación entre los niveles intracelulares de ATP y de ADP. Así, la eficacia de la glucólisis en espermatozoide de cerdo depende básicamente de dos factores: el tipo de sustrato exógeno consumido y los niveles intracelulares de ATP y ADP. Además, algunas proteínas clave de la glucólisis, como el GLUT-3 y la hexoquinasa-I se distribuyen de manera no uniforme, con una tendencia a la agrupación, haciendo pensar que la glucólisis se lleva a cabo en el espermatozoide de cerdo de una manera dependiente del espacio. Finalmente, ningún efecto claro sobre el patrón Tyr-Phos se observa tras la incubación con cualquiera de los monosacáridos, indicando por lo tanto que estos sustratos no modulan específicamente la funcionalidad espermática porcina.

2. MATERIAL Y METODOS.

2.1. Recogida y procesado del semen

El semen se obtuvo a partir de 15 cerdos sanos y sexualmente maduros, pertenecientes a una graja comercial (Servicios Genéticos Porcinos, S.L.; Roda de Ter, España). Los cerdos eran 6 Blancos Belgas, 5 Large White x Pietrain, 2 Pietrain y 2 Landrace, que tenían entre 2-3 años de edad. La fracción rica del eyaculado se recogió manualmente e inmediatamente se colocó en un baño termostático a 37°C. El semen fue inmediatamente diluido a una concentración de 2×10^7 espermatozoides/mL en un diluyente comercial para semen refrigerado (MR-UN extender. Kubus, S.A.;

Majadahonda, España) y se dividió en dosis comerciales para IA de 100 mL. Las concentraciones de estas dosis fueron determinadas utilizando una cámara celular hemocitométrica. Cuatro de las dosis de 100 mL obtenidas se colocaron en un refrigerador portátil a 16°C durante aproximadamente 90 minutos que fue el tiempo empleado para llegar al laboratorio. Una vez allá, las muestras se centrifugaron a 600g durante 10 minutos a 16°C en una centrifuga de temperatura controlada, y el sedimento resultante se resuspendió en 50 mL de una solución de Krebs-Ringer-Henseleit carente de azúcares a 16°C (solución KRH; pH: 7,4). El semen se centrifugo de nuevo durante 10 minutos a 16°C y las células del sedimento fueron nuevamente resuspendidas en 50 mL de solución KRH. Este proceso de centrifugación y resuspensión fue repetido una vez más para eliminar cualquier resto de plasma seminal o del diluyente comercial. Al final, 50 mL de suspensión espermática fue nuevamente centrifugada a 600g durante 10 minutos a 16°C y el sedimento celular fue finalmente resuspendido en 2 mL de solución de KRH. En este momento, las células resuspendidas producto de las cuatro dosis de 100 mL fueron mezcladas y luego se distribuyeron en tubos abiertos e incubados a 37°C, con o sin adición de los diferentes monosacáridos a las concentraciones apropiadas al medio según el experimento. Tras el oportuno tiempo de incubación, se tomaron alícuotas de los espermatozoides y se trataron dependiendo del análisis requerido. Los tratamientos realizados fueron los siguientes:

Para determinar los porcentajes de viabilidad y de acrosomas alterados, se tomaron alícuotas de 30µL e inmediatamente se tiñeron mediante la técnica de eosina-nigrosina (Bamba, 1998), modificado según Quintero-Moreno et al. (2004). Los porcentajes de viabilidad y acrosomas alterados se determinaron tras contar de 200 a 300 espermatozoides en cada punto. Para determinar los niveles extracelulares de lactato, así como los niveles intracelulares de G 6-P, glucógeno y ATP, se tomaron alícuotas de 250

μL de las suspensiones espermáticas e inmediatamente se centrifugaron a 1000g durante 1 minuto, separándose inmediatamente después los sedimentos celulares y los sobrenadantes. Las dos fracciones así obtenidas fueron inmediatamente congelados en nitrógeno líquido, guardándose a -80°C hasta el momento del análisis. Los sobrenadantes se utilizaron para determinar los niveles extracelulares de lactato, mientras que los sedimentos espermáticos se utilizaron para determinar los niveles intracelulares de G 6-P, glucógeno y ATP. Además, en todos los casos, se separaron alícuotas celulares de 10 μL para determinar la proteína total de la muestra.

Para la determinación de los niveles intracelulares G 6-P y ATP, los sedimentos celulares congelados se descongelaron y homogenizaron simultáneamente por sonicación en 300 μL de solución 10% (v/v) de HClO_4 fría. Los homogenizados se centrifugaron a 10000 g por 15 minutos a 4°C , y los sobrenadantes obtenidos se neutralizaron con una solución K_2CO_3 5M inmediatamente antes del análisis.

Para la determinación del contenido de glucógeno, los sedimentos espermáticos congelados fueron descongelados y simultáneamente homogenizados por sonicación con 300 μL de solución al 30 % p/v de KOH, y luego llevadas a ebullición durante 15 minutos. El extracto así obtenido fue utilizado para el análisis.

Las determinaciones de las actividades PK y hexoquinasa se llevaron a cabo utilizando dosis comerciales para IA completas, las cuales fueron inmediatamente centrifugadas a 600 g por 10 minutos a 16°C . Los sedimentos espermáticos así obtenidos fueron resuspendidos en 50 mL de solución KRH. Tras ello, el proceso de centrifugación y resuspensión se repitió dos veces más hasta eliminar completamente todas las sustancias incluidas en el medio que pudieran afectar las propiedades cinéticas de estas enzimas. Finalmente, los últimos 50 mL de suspensión fueron nuevamente centrifugados a 600 g durante 10 minutos a 16°C . Luego, el sobrenadante fue descartado y el sedimento

celular resultante fue homogenizado por sonicación en 500µL de una solución tampón específica para la determinación de las actividades hexoquinasa y PK (tampón de homogenización). Las muestras así homogenizadas fueron centrifugadas a 10000 g durante 15 minutos a 4°C. La actividad enzimática fue medida en el sobrenadante y el sedimento resultante, el cual fue lavado una vez en 500µL con el tampón de homogenización respectivo para eliminar toda posible actividad enzimática asociada al sobrenadante. Al final, el sedimento lavado fue resuspendido en 250 µL del respectivo tampón de homogenización. De nuevo, se tomaron alícuotas de 10 µL de tanto el sobrenadante como el sedimento resuspendido para determinar la proteína total de la muestra. El tampón de homogenización específico para determinar la actividad hexoquinasa estaba compuesto por glicilglicina 500 mM (pH 7,4), adicionado con 2M KCl, 100 mM ditioneitol, 300 UI/mL de aprotinina y 100 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo. Por otro lado, el tampón de homogenización específico para determinar la actividad PK estaba compuesto por tampón glicilglicina 50 mM (pH 7,4) adicionado con 15 mM de ácido etilen diamino tetra acético, 100mM de KF y 100 mM KH_2PO_4 .

Para la determinación del ritmo de formación de CO_2 , se procesaron 4 dosis comerciales para IA agrupadas de la manera descrita anteriormente. Alícuotas de 500µL de la suspensión espermática final en solución KRH fueron incubadas durante 60 minutos a 37°C en viales cerrados en presencia de concentraciones crecientes de $[\text{U}^{14}\text{C}]$ glucosa o $[\text{U}^{14}\text{C}]$ fructosa. La cantidad total de radioactividad agregada en cada vial era de aproximadamente 1.330.000 cpm en el caso de la $[\text{U}^{14}\text{C}]$ glucosa y de aproximadamente 1.380.000 en el caso de $[\text{U}^{14}\text{C}]$ fructosa. Al final de las incubaciones, un trozo de papel de filtro empapado con 200 µL de feniletilamina se colocó en cada uno de los viales evitando el contacto directo con la suspensión. Tras ello, se agregaron 85 µL de HClO_4

10 % (v/v) a la suspensión espermática, tras lo que los viales fueron incubados durante 30 minutos más en agitación suave. Finalmente, se determinó la radioactividad absorbida por el papel filtro mediante un contador de centelleo líquido. Antes de agregar el material radiactivo, una alícuota de 10 μ L de la suspensión espermática fue tomada para determinar la proteína total de la muestra.

2.2. Procedimientos analíticos

Los niveles de G 6-P fueron determinados enzimáticamente como describe Michal (1984), y siguiendo las modificaciones descritas en Rigau et al. (2002) para aumentar la precisión del análisis.

Las concentraciones de L-lactato (Noll, 1984), glucógeno (Ballester et al., 2000) y ATP (Lambrecht y Trantschold, 1984) y la actividad lactato deshidrogenasa (Wahfeld, 1984) fueron determinados por las técnicas enzimáticas citadas. Todas estas técnicas, así como la utilizada para determinar G 6-P, fueron adaptadas a un autoanalizador centrífugo Cobas Bio (Roche biomedical; Basilea, Suiza).

El volumen total de proteína de las muestras fue determinado utilizando la técnica de Bradford (Bradford, 1976), utilizando un kit comercial (Laboratorios Bio-Rad; Hércules, CA).

2.3. Análisis de Western blot

El análisis inmunológico mediante Western blot se llevó a cabo en espermatozoides de cerdo que se homogenizaron por sonicación en una solución tampón refrigerada compuesta por Tris/HCl 10 mM (pH 7,4), que contenía además 1% (p/v) de dodecil sulfato de sodio (SDS) y 1M de Na_2VO_4 (en una proporción 1:5, v/v) para evitar cambios en el estado de fosforilación global de los homogenizados (tampón Western). Las muestras fueron llevadas a ebullición brevemente y luego se centrifugaron a 10000 g durante 15 minutos a 4°C. El Western blot se realizó tanto en los sobrenadantes como

en los sedimentos espermáticos obtenidos. Los espermatozoides homogenizados con tampón Western también se utilizaron para los Western blot sin la separación por centrifugación en sobrenadante y sedimento. El análisis inmunológico de los homogenizados resultantes y los sobrenadantes se basó en una electroforesis en gel de poliacrilamida/SDS (Laemmli, 1970), seguido de la transferencia de las proteínas a una matriz de nitrocelulosa (Burnett, 1981). Las muestras transferidas se incubaron con los anticuerpos a una dilución (v/v) de 1:500 (anti-GLUT 3) y de 1:1000 (anti-hexoquinasa-I y anti-fosfotirosina). La inmunoreactividad específica se puso de manifiesto utilizando un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa (Amersham; Little Chalfont, Reino Unido) y la reacción se reveló mediante el sistema ECL-Plus Detection System (Amersham).

Los espermatozoides de perro utilizados como control en algunos análisis de Western blot se obtuvieron de perros Beagle sanos y sexualmente maduros pertenecientes al “Servei d’Estabulari” de la Universidad Autónoma de Barcelona. Estas muestras fueron procesadas de la misma forma anteriormente descrita para los espermatozoides de cerdo. Los extractos de hígado de rata utilizados como control en algunos Western blot fueron donados por personal del “Pac Científic de Barcelona” (Universidad de Barcelona).

2.4. Técnica de inmunogold

Para llevar a cabo la técnica de inmunogold, alícuotas de muestras espermáticas lavadas e incubadas con azúcares tal y como se ha descrito anteriormente se centrifugaron a 600 g durante 10 minutos. Los sedimentos obtenidos se fijaron con tampón cacodilato 0,1 M (Tampón caco; pH 7,4) el cual contenía 3% (p/v) de paraformaldehído y 0,05 % (v/v) de glutaraldehído durante 2 horas a 4°C. Tras este paso, los espermatozoides fijados se lavaron 4 veces con Tampón caco, y

posteriormente e incubaron dos veces durante 15 minutos a 4°C en una solución 150 mM NH₄Cl. Tras estas incubaciones, se lavaron nuevamente las muestras con Tampón caco 4 veces, y posteriormente se sometieron a una deshidratación a través de concentraciones crecientes de etanol. Las muestras así deshidratadas eran luego pre-incluidas en una solución de agar al 2% (p/v) y entonces fueron embebidas en resina Lowicril (Electrón Microscopy Science; Washington, CL), induciendo luego la polimerización de la resina mediante estimulación ultravioleta (longitud de onda: 30-40 cm) durante 48 horas a -35°C. Luego, las muestras eran seccionadas finamente sobre rejillas de oro, y la técnica de inmugold se aplicó sobre estas muestras.

Para llevar a cabo la técnica del inmunogold las muestras fijadas sobre rejillas de oro se preincubaron con un tampón fosfato salino (PBS; a pH 7,4) conteniendo 3 % (p/v) de albúmina serica bovina (BSA) y 20 mM de glicina durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras esto, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario específico a una dilución 1:10 (v/v) en PBS adicionado con 3 % (p/v) BSA y 0,01 % (v/v) Tween-20 durante 2 h a temperatura ambiente. Las muestras fueron luego lavadas 4 veces con PBS que contenía 3 % (p/v) de BSA y 0,01 % (v/v) de Tween-20 durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego se incubaron con un anticuerpo secundario cerdo, anti-conejo conjugado con partículas de oro de 15 nm (BBI internacional; Cardiff, Reino Unido). Este anticuerpo secundario se utilizó a una dilución 1:25 (v/v) en PBS adicionado con 3 % de BSA (p/v) y 0,01 % de Tween-20 (v/v). La incubación se mantuvo durante una hora a temperatura ambiente. Tras este paso, las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS y posteriormente se lavaron 3 veces más con agua tri-distilada. El paso final consistió en contrastar utilizando una doble tinción mediante una primera incubación durante 15 minutos con 2% (p/v) de acetato de uranilo seguida de una segunda incubación durante 5 minutos con 2% (p/v) de acetato de plomo, siguiendo

la técnica descrita por Dysktra (1992). Las muestras utilizadas como control negativo fueron procesadas como se describe anteriormente exceptuando el paso la incubación con el anticuerpo primario. La presencia de signos positivos en las muestras fue determinada mediante la observación en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss 910 EM (Servei de Microscopia Electrónica; Universidad Autònoma de Barcelona).

2.5. Análisis estadísticos.

Cuando fue oportuno, la posible significancia en las diferencias estadísticas entre los resultados fueron calculadas mediante dos procedimientos: ANOVA en aquellos datos no apareados, o test de Student en resultados pareados.

2.6. Materiales.

Los anticuerpos primarios anti-GLUT 3 de rata y anti-hexoquinasa-I de rata se obtuvieron de Chemicon Internacional (Termeçula, CA). El anticuerpo primario anti-fosfo tirosina de ratón (PY20) se compró a Transducción Laboratorios (Lexington, KY). La [U¹⁴C] glucosa y la [U¹⁴C] fructosa se compraron a Amersham. La glucosa, la fructosa, la manosa y el sorbitol provenían de Merck (Darmstadt, Alemania). Todos los otros reactivos eran de pureza analítica y fueron proporcionados por Sigma (St. Louis, MO), Merck, Bio Rad (Hercules, CA) y EMS (Fort Washington, PA).

3. RESULTADOS.

3.1. Variaciones en los porcentajes de viabilidad y de acrosomas alterados en espermatozoides de cerdo incubados en presencia o ausencia de monosacáridos.

Los espermatozoides de cerdo incubados en un medio carente de azúcares mostraron un decrecimiento progresivo y dependiente del tiempo de su porcentaje de viabilidad, que varió desde un 90,6±1,3 % al inicio de la incubación, hasta un 73,1± 1,1 % tras 60

minutos (Fig. 1A). Una disminución similar se observó cuando las células fueron incubadas en presencia tanto de sorbitol 10 mM como de manosa 10 mM. Sin embargo, la adición tanto de fructosa 10 mM como de glucosa 10 mM neutralizaron casi completamente esta disminución hasta los 60 minutos de incubación (Fig. 1A). Esta acción neutralizadora también fue dosis-dependiente, mostrándose efectos significativos a concentraciones de azúcar tan bajas como 1mM, con un efecto máximo a concentraciones de azúcares de entre 10mM y 20mM (Fig. 1B).

El porcentaje de acrosomas alterados aumentó de forma dependiente del tiempo en células incubadas en ausencia de azúcares. Este incremento fue paralelo a la disminución de la viabilidad descrita anteriormente. Así, como se muestra en la Figura 1C, el porcentaje de acrosomas alterados varió desde el $16,1 \pm 0,9$ % en el tiempo 0 hasta $23,9 \pm 1,8$ % tras 60 minutos de incubación. Al contrario que en el caso de la viabilidad, la adición de ninguno de los azúcares anuló o modificó este incremento, bajo ninguna de las condiciones estudiadas (Fig. 1C).

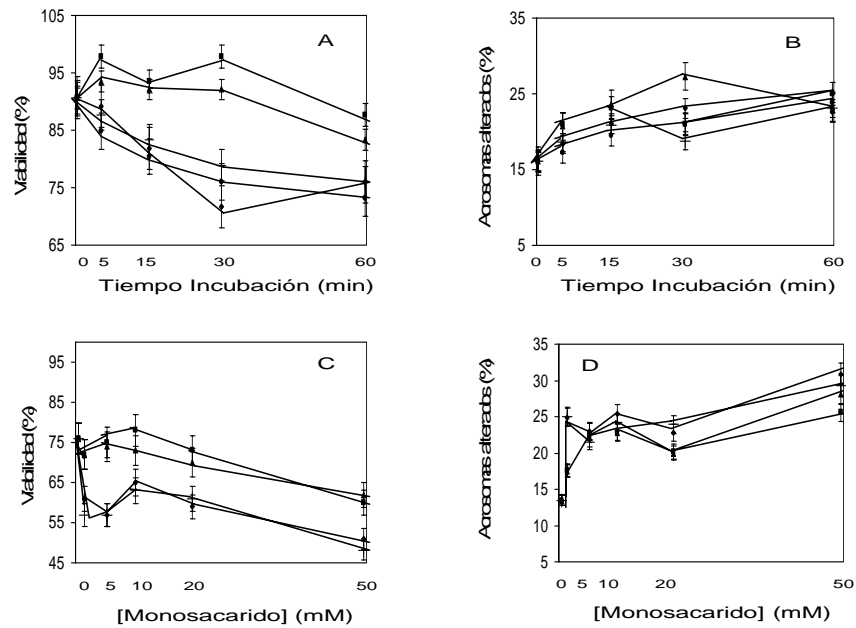


Figura 1

Figura 1. Efectos dependientes del tiempo y de la concentración de los monosacáridos sobre los porcentajes de viabilidad y de acrosomas alterados de espermatozoides porcinos provenientes de eyaculados frescos. A,C: Los espermatozoides se incubaron en ausencia (●) o en presencia de glucosa 10 mM (■), fructosa 10 mM (▲), manosa 10 mM (◆) o sorbitol 10 mM (⊕). En los tiempos indicados en la Figura, se tomaron alícuotas, sobre las que se determinaron los porcentajes de viabilidad (A) y de acrosomas alterados (C). B,D: Los espermatozoides se incubaron durante 60 minutos en presencia de las concentraciones indicadas de glucosa (■), fructosa (▲), manosa (◆) y sorbitol (⊕). Tras este tiempo, se tomaron alícuotas, en las que se determinaron los porcentajes de viabilidad (B) y de acrosomas alterados (D). Los resultados mostrados son medias \pm S.E.M. provenientes de 8 experimentos diferentes.

3.2. Efecto de la incubación con monosacáridos sobre los niveles intracelulares de glucosa 6-fosfato y de glucógeno en espermatozoides de cerdo provenientes de eyaculados frescos.

Espermatozoides recién obtenidos de cerdo e incubados en un medio carente de azúcares no mostraron niveles intracelulares perceptibles de G 6-P (Fig. 2A). La incubación de los espermatozoides con concentraciones de 10 mM de glucosa indujo un rápido y marcado incremento en los niveles intracelulares de G 6-P, alcanzando valores máximos tras 5 minutos de incubación de $(2,4 \pm 1,8 \text{ nmol/mg de proteína})$, ver Fig. 2A). El incremento inducido por glucosa de los niveles intracelulares de G 6-P fue transitorio, y así, tras 15 minutos de incubación no se detectaron niveles apreciables del metabolito en los extractos celulares (Fig. 2A). Un efecto similar, aunque de menor intensidad se observó en espermatozoides incubados en presencia de 10 mM fructosa, 10mM sorbitol y 10mM manosa, obteniéndose valores máximos de G 6-P en todos los casos tras 5 minutos de incubación (Fig. 2A).

La intensidad del incremento en los niveles de G 6-P tras 5 minutos de incubación era dependiente de la concentración de azúcares en las células incubadas en presencia de éstos. Como se muestra en la Figura 2B, los efectos máximos fueron observados a concentraciones de 50 mM en todos los casos. La glucosa fue el azúcar que mostró el efecto máximo, alcanzando niveles de G 6-P de $5,3 \pm 1,3 \text{ nmol/ mg de proteína}$ con concentraciones del azúcar de 50 mM. Por otro lado, la fructosa no indujo la aparición niveles significantes de G 6-P tras 5 min de incubación en cualquiera de las concentraciones probadas (Fig. 2B).

Los espermatozoides de cerdo provenientes de eyaculados frescos mostraron niveles significativos de glucógeno intracelular, con valores de $56,2 \pm 3,5 \text{ nmol de glucosa/ mg de proteína}$. El contenido de glucógeno intracelular decreció ligeramente en las células

incubadas en un medio carente de azúcares, alcanzando valores de $41,8 \pm 1,1$ nmol de glucosa/ mg de proteína tras 60 minutos de incubación (Fig. 2C). Como se muestra en la Figura 2C, la incubación de células con los diferentes azúcares indujo en todos los casos un aumento significativo en los niveles intracelulares de glucógeno, aunque el efecto varió dependiendo del azúcar utilizado en cada caso. Así, la adición de glucosa a concentraciones de 10 mM indujo un rápido aumento en los niveles de glucógeno, alcanzando valores máximos tras 15-30 minutos de incubación. Por el contrario, la incubación con 10 mM de sorbitol o 10 mM de manosa indujo un aumento más lento en estos niveles, alcanzándose los valores máximos sólo tras 60 minutos de incubación. Finalmente concentraciones de 10 mM de fructosa indujeron también un rápido incremento en los niveles de glucógeno alcanzando un valor máximo de $107,9 \pm 19,1$ nmol de glucosa/ mg de proteína tras 30 minutos de incubación. Sin embargo, los niveles de glucógeno disminuyeron posteriormente, alcanzando valores de sólo $56,5 \pm 10,3$ nmol de glucosa /mg de proteína tras 60 minutos de incubación (Fig. 2C).

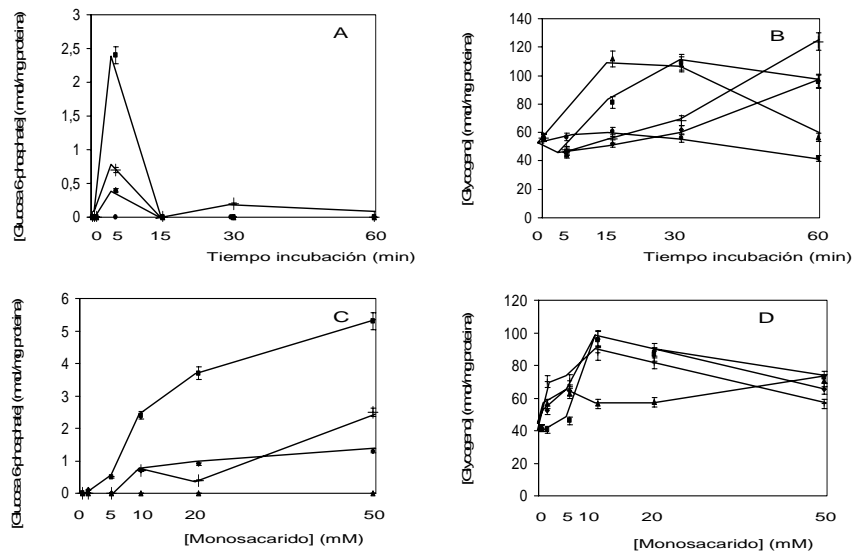


Figura 2

Figura 2. Efectos dependientes del tiempo y de la concentración de los monosacáridos sobre los niveles intracelulares de glucosa 6-fosfato y de glucógeno de espermatozoides porcinos provenientes de eyaculados frescos. A,C: Los espermatozoides se incubaron en ausencia (●) o en presencia de glucosa 10 mM (■), fructosa 10 mM (▲), manosa 10 mM (◆) o sorbitol 10 mM (⊕). En los tiempos indicados en la Figura, se tomaron alícuotas, sobre las que se determinaron los niveles intracelulares de glucosa 6-fosfato (A) y de glucógeno (C). B,D: Los espermatozoides se incubaron durante 5 minutos (B) o durante 60 minutos (D) en presencia de las concentraciones indicadas de glucosa (■), fructosa (▲), manosa (◆) y sorbitol (⊕). Tras estos tiempos, se tomaron alícuotas, en las que se determinaron los niveles intracelulares de glucosa 6-fosfato (B) y de glucógeno (D). Los resultados mostrados son medias \pm S.E.M. provenientes de 8 experimentos diferentes.

Estos resultados indican que la dinámica de la síntesis del glucógeno depende en gran medida del sustrato específico a partir del cual se sintetiza el polisacárido.

La síntesis de glucógeno inducida por la incubación con hexosas también fue dosis-dependiente, observándose nuevamente diferencias entre las diferentes azúcares. Así, los efectos máximos alcanzados con la glucosa, el sorbitol y la manosa fueron observados a concentraciones de entre 10 mM y 20 mM, considerando que a concentraciones menores los efectos sobre la síntesis de glucógenos fueron muy pequeños (Fig. 2D). Por el contrario, los efectos máximos inducidos por la fructosa sobre la síntesis de glucógeno se observaron a concentraciones tan bajas como 5 mM, a pareciendo sólo un ligero aumento a concentraciones superiores (Fig. 2D).

3.3. Efecto de los monosacáridos sobre el contenido intracelular de ATP en espermatozoides de cerdo de eyaculados frescos.

La incubación de espermatozoides de cerdo en un medio en ausencia de azúcares produjo una disminución progresiva en los niveles intracelulares de ATP, alcanzando valores por debajo de 2 nmol/ mg de proteína tras 60 minutos de incubación (Fig. 3A). Todos los monosacáridos analizados, a concentraciones de 10 mM, provocaron un incremento muy fuerte y rápido en los niveles de ATP, con un efecto máximo en todos los casos tras sólo 1 minuto de incubación (Fig. 3A). Este efecto máximo fue similar tras la incubación con glucosa, fructosa y sorbitol, alcanzando valores máximos de 20 nmol/ mg de proteína. El incremento de ATP fue menos intenso en las células incubadas con 10 mM de manosa, en donde sólo llegaron hasta valores de $17,3 \pm 1,8$ nmol/ mg de proteína tras 1 minuto de incubación (Fig. 3A). Tras este pico, se observó en todos los casos una disminución progresiva y dependiente del tiempo en los niveles intracelulares de ATP. Esta disminución fue muy similar en todos los casos, independientemente del azúcar utilizado. Hay que destacar que la incubación con cualquiera de los azúcares

mantuvo siempre los niveles intracelulares de ATP entre unos límites muy estrechos, entre 10 nmol/mg de proteína y 15 nmol /mg de proteína, incluso tras 30-60 minutos de incubación (Fig. 3A). Estos valores de ATP fueron muy superiores a los determinados en células incubadas sin azúcares durante el mismo período de tiempo (Fig. 3A).

Los efectos de los monosacáridos sobre los niveles de ATP fueron también dependientes de la concentración. Como se muestra en la Fig. 3B, Los espermatozoides de cerdo son muy sensibles a los azúcares en este respecto, y, así, efectos cercanos a los máximos se lograron a concentraciones de monosacáridos tan bajas como 1-5 mM, siendo la glucosa y la fructosa los azúcares que mostraron un efecto más intenso, especialmente a la concentración de 20 mM (Fig. 3B).

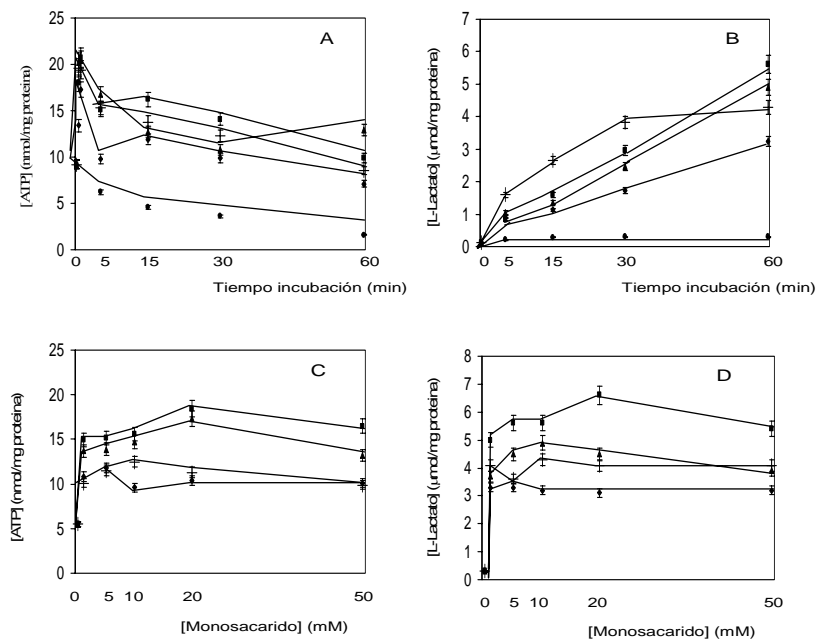


Figura 3

Figura 3. Efectos dependientes del tiempo y de la concentración de los monosacáridos sobre los niveles intracelulares de ATP y de la concentración extracelular de L-lactato de espermatozoides porcinos provenientes de eyaculados frescos. A,C: Los espermatozoides se incubaron en ausencia (●) o en presencia de glucosa 10 mM (■), fructosa 10 mM (▲), manosa 10 mM (◆) o sorbitol 10 mM (⊕). En los tiempos indicados en la figura, se tomaron alícuotas, sobre las que se determinaron los niveles intracelulares de ATP (A) y los extracelulares de L-lactato (C). B,D: Los espermatozoides se incubaron durante 15 minutos (B) o durante 60 minutos (D) en presencia de las concentraciones indicadas de glucosa (■), fructosa (▲), manosa (◆) y sorbitol (⊕). Tras estos tiempos, se tomaron alícuotas, en las que se determinaron los niveles intracelulares de ATP (B) y la concentración extracelular de L-lactato (D). Los resultados mostrados son medias \pm S.E.M. provenientes de 8 experimentos diferentes.

3.4. Efecto de los monosacáridos sobre la producción de L-lactato en espermatozoides de cerdo.

Los azúcares provocaron en todos los casos un progresivo aumento dependiente del tiempo en los niveles extracelulares de L-lactato alcanzando valores máximos tras 60 minutos de incubación. Sin embargo, algunas diferencias en el ritmo de formación de L-lactato se pudieron apreciar entre los distintos monosacáridos. Así, el sorbitol a concentraciones de 10 mM indujo un aumento muy rápido durante los primeros 30 minutos, manteniéndose a partir de entonces un ritmo de lactato génesis menos intenso, aunque continuado. Por el contrario, la adición de 10 mM de glucosa, 10 mM de fructosa y 10 mM de manosa provocaron un incremento el ritmo de formación de lactato menos intenso inicialmente, aunque sostenido de manera constante en el tiempo. También es digno de notar que la incubación con 10 mM de glucosa indujo los valores máximos de L-lactato tras 60 minutos de incubación en comparación con los otros

azúcares, alcanzando niveles de $5,61 \pm 0,05 \mu\text{mol/ mg}$ de proteína (Fig. 3C). En el lado opuesto, el monosacárido que indujo la producción mas baja de L-lactato fue la manosa, con valores de $3,24 \pm 0,03 \mu\text{mol/ mg}$ de proteína tras 60 minutos de incubación a concentraciones del azúcar de 10 mM (Fig. 3C).

Nuevamente, los efectos de los azúcares sobre la producción de L-lactato fueron dependientes de la concentración, observándose también una alta sensibilidad a las bajas concentraciones de los efectores. En este sentido, el máximo efecto fue obtenido a concentraciones de fructosa, sorbitol y manosa tan bajas como 1 mM. La glucosa, si bien mostró su máximo efecto ($6,63 \pm 0,09 \mu\text{mol/mg}$ de proteína) a 20 mM, también presentó una acción submáxima a concentraciones tan bajas como 1 mM (Fig. 3D).

3.5. Efectos de la glucosa y la fructosa sobre la producción de CO₂ en espermatozoides de cerdo.

La incubación de espermatozoides de cerdo con ¹⁴C-glucosa y ¹⁴C-fructosa indujo en ambos casos un incremento dependiente de la concentración en la producción de ¹⁴CO₂, que alcanzo niveles máximos a las concentraciones de azúcares de entre 10 mM y 20mM (Fig. 4). La sensibilidad de las células de cerdo a la producción de CO₂ a partir de concentraciones bajas de fructosa fue mayor que para la glucosa, ya que la incubación con concentraciones 5 mM de ¹⁴C-fructosa indujo una producción de CO₂ mucho mayor ($31,7 \pm 4,1 \text{ nmol/ mg}$ de proteína) que con 5mM de ¹⁴C-glucosa ($16,9 \pm 2,9 \text{ nmol/ mg}$ de proteína, ver Fig. 4). Sin embargo, en ambos casos la producción de CO₂ fue baja cuando se comparó con la producción de L-lactato ante los mismos substratos. No se pudo determinar la producción de ¹⁴CO₂ en presencia de manosa y sorbitol ya que no se encontró disponibles en el mercado formas marcadas con ¹⁴C de estos azúcares.

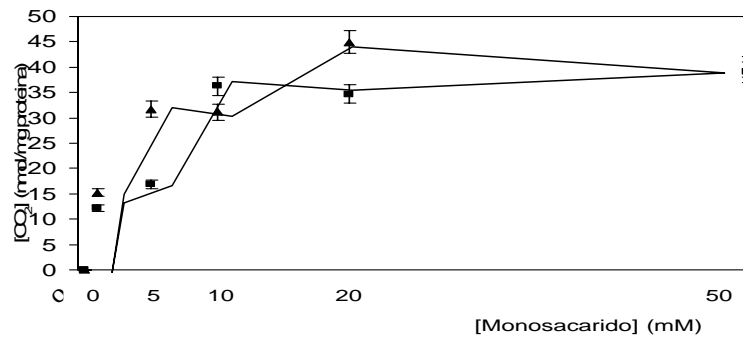


Figura 4

Figura 4. Efectos dependientes de la concentración de glucosa y fructosa sobre el ritmo de formación de CO₂ de espermatozoides porcinos provenientes de eyaculados frescos. Los espermatozoides se incubaron durante 60 minutos en presencia de las concentraciones indicadas de glucosa (■) y de fructosa. Tras este tiempo, se tomaron alícuotas, en las que se determinó la formación extracelular de CO₂. Los resultados mostrados son medias ±S.E.M. provenientes de 8 experimentos diferentes.

3.6. Modulación de la actividad hexoquinasa total en extractos espermáticos de cerdo por parte de glucosa, fructosa, manosa y sorbitol

En un artículo ya publicado (Fernández-Novell et al., 2004), nuestro laboratorio determinó, tras un análisis cinético, que el espermatozoides de cerdo tenía una sola actividad hexoquinasa, con una Km teórica estimada para la glucosa de 0,05mM.

Teniendo este conocimiento previo, nuestra intención en este trabajo fue la de determinar las diferencias de sensibilidad a la actividad hexoquinasa de los espermatozoides de cerdo que pudieran presentar los diferentes monosacáridos utilizados. En este sentido, La actividad hexoquinasa total de los extractos espermáticos de cerdo fue mucho más sensible a la presencia de glucosa que a la de los otros azúcares. Como se muestra en la Figura 5A, la actividad hexoquinasa total de los sobre nadantes fue elevada ($1,7 \pm 0,1$ mUI / mg de proteínas) a concentraciones de glucosa tan bajas como 0,1 mM, alcanzando valores máximos a concentraciones de glucosa de 5 mM. Tanto la fructosa como la manosa y el sorbitol mostraron un efecto muy similar, si bien en ambos casos la actividad hexoquinasa total máxima del sobre nadante era bastante más baja que la determinada en presencia de glucosa (aproximadamente 1 mUI/mg de proteína a concentraciones de 50 mM en todos los casos). Una diferencia aun mayor fue hallada en los sedimentos resuspendidos. En este caso, la actividad hexoquinasa total era también muy sensible a glucosa, observándose un aumento progresivo en la actividad desde 0,1 mM de glucosa ($3,8 \pm$ may/ mg de proteína) hasta 50 mM de glucosa ($6,7 \pm 1,2$ mUI / mg de proteína, ver Fig. 5B). Por el contrario, la fructosa solo activa la actividad hexoquinasa total en los sedimentos resuspendidos a concentraciones sobre 5mM, mientras que tanto la manosa como el sorbitol eran incapaces de inducir una actividad hexoquinasa significativa a cualquiera de las concentraciones probadas (Fig. 5B).

3.7. Actividad cinética total de la piruvato quinasa en espermatozoides de cerdo.

Los extractos espermáticos de cerdo mostraron la presencia de una actividad PK total activable por ADP, tanto en los sobre nadantes como en los sedimentos resuspendidos. Así, la actividad PK total aumentó aproximadamente 20 veces en los sobre nadantes

cuando se midió en la presencia de ADP 1,25 mM (Fig. 6A). Lógicamente, la actividad de PK activada por ADP fue dependiente de las concentraciones de fosfoenol piruvato.

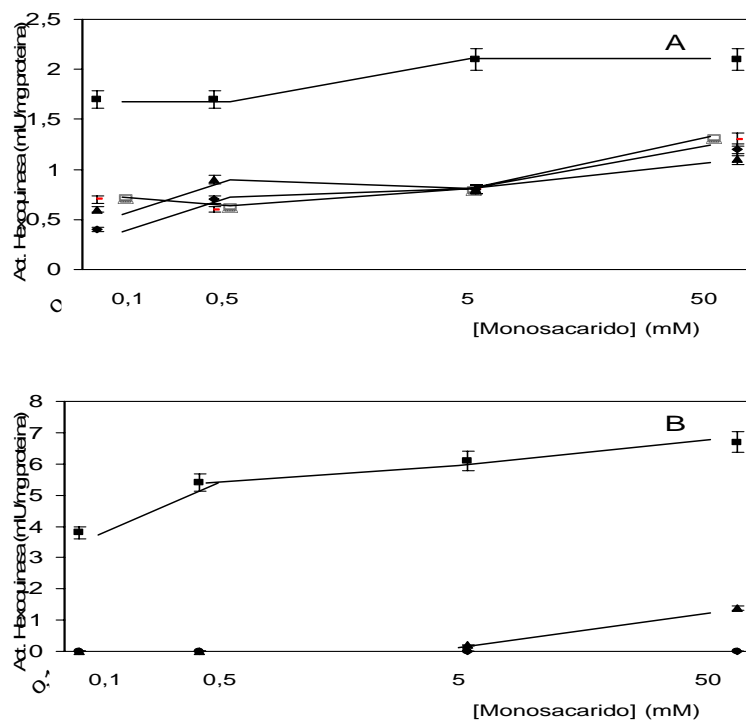


Figura 5

Figura 5. Sensibilidad de la actividad hexoquinasa total de espermatozoides de cerdo procedentes de eyaculados frescos frente a la glucosa, la fructosa, la manosa y el sorbitol. La actividad hexoquinasa total fue determinada en presencia de las concentraciones indicadas de glucosa (■), fructosa (▲), manosa (◆) y sorbitol (⊕), tanto en los sobre nadantes (A) como en los sedimentos resuspendidos obtenidos a partir de homogenizados espermáticos porcinos (B). La actividad hexoquinasa total se determinó siguiendo la metodología descrita en el apartado de Material y Métodos. Los resultados mostrados son medias \pm S.E.M. provenientes de 8 experimentos diferentes.

(PEP). A este respecto, hubo un brusco y progresivo aumento en la actividad PK desde 0,05 mM PEP hasta 4-5 mM PEP, con una máxima actividad de $126,4 \pm 7,3$ mUI/ mg de proteína a 4 mM de PEP (Fig.6A). Los sedimentos espermáticos resuspendidos mostraron una actividad PK mucho menor, que también fue ADP-dependiente, a concentraciones de PEP de 0,05mM a 2mM (Fig. 6B). Al contrario que en los sobrenadantes, la actividad PK total de los sedimentos resuspendidos a concentraciones de PEP de 2mM no mostró diferencias en presencia o ausencia de 1,25 mM de ADP, indicando que estas concentraciones de PEP indujeron una saturación del sistema enzimático de la PK, independientemente de la presencia de ADP en el medio (Fig. 6B).

La representación de Lineweaver-Burke de la actividad de PK en los sobrenadantes y sedimentos resuspendidos de extractos espermáticos de cerdo fue compatible con la presencia de una sola actividad PK. Esta actividad mostró en el sobrenadante una K_m teórica estimada de aproximadamente 0,15-0,20 mM, tanto en presencia como en ausencia de ADP (Fig. 6C). Resultados similares, aunque con una K_m teórica estimada de 0,9-1 mM, se observó en sedimentos resuspendidos, tanto en presencia como en ausencia de ADP (Fig. 6D). Estos últimos resultados sugieren que la presencia de ADP aumenta la actividad PK sin modificar la sensibilidad del enzima al PEP.

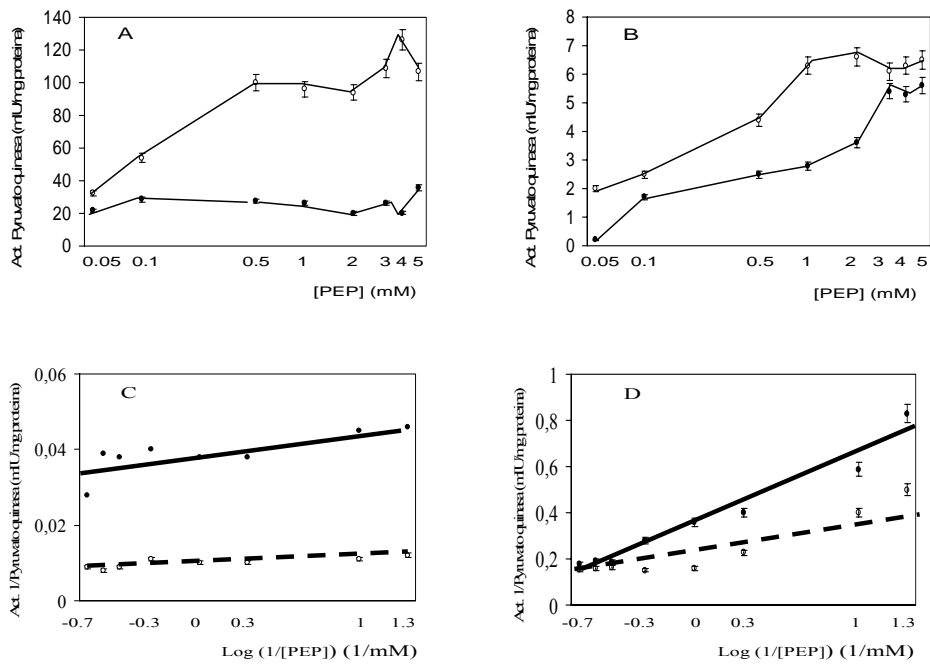


Figura 6

Figura 6. Cinética de la actividad piruvato quinasa de espermatozoides porcinos. A: Relación entre la actividad piruvato quinasa total y la concentración de fosfofenol piruvato en sobre nadantes obtenidos a partir de homogenizados espermáticos porcinos. La actividad enzimática se determinó en ausencia (●) o en presencia de ADP 1.25 mM (○). B: Relación entre la actividad piruvato quinasa total y la concentración de fosfofenol piruvato en sedimentos resuspendidos obtenidos a partir de homogenizados espermáticos porcinos. La actividad enzimática se determinó en ausencia (●) o en presencia de ADP 1.25 mM (○). C,D: Representación semi logarítmica de los valores inversos de la actividad piruvato quinasa total en relación a la concentración de

fosfoenol piruvato en sobre nadantes (C) y sedimentos resuspendidos (D) provenientes de extractos espermáticos porcinos. Las líneas muestran los diversos tipos aparentes de actividad piruvato quinasa detectados en ausencia (● y línea continua) y en presencia de ADP 1.25 mM (○ y línea a trazos) detectados mediante esta representación. La actividad piruvato quinasa total se determinó siguiendo la metodología descrita en el apartado de Material y Métodos. Los resultados mostrados son medias \pm S.E.M. provenientes de 8 experimentos diferentes.

3.8. Localización del transportador de hexosas GLUT-3 y de la hexoquinasa-I en los espermatozoides de cerdo.

Al analizar los Western blot en los que usamos un anticuerpo anti-GLUT-3 se evidenció la presencia de una banda específica, de aproximadamente 45 Kda, en extractos espermáticos de cerdo (Fig. 7A) Este resultado concuerda con lo observado en espermatozoides de perro, publicado con anterioridad (Fig. 7A y Rigau et al ., 2002). Esta banda específica es, pues, compatible con la presencia de GLUT-3 en espermatozoides de cerdo. El análisis de la técnica de inmunogold también mostró la presencia de GLUT-3 en la cabeza y la pieza intermedia de los espermatozoides. La señal del GLUT-3 no era abundante, y se localizaba en la membrana citoplasmática externa y en el interior de la cabeza así como en la membrana mitocondrial externa de la vaina mitocondrial, en la pieza intermedia (Fig.7C y 7D). Hay que destacar que el GLUT-3 también se localizaba en fragmentos de la membrana que se separaban de los espermatozoides como consecuencia de la fijación celular y el procesamiento inherente a la técnica (datos no mostrados). Además, la presencia GLUT-3 era detectada más frecuentemente como agrupaciones de partículas de oro, en lugar de señales simples y aisladas. Este fenómeno era especialmente remarcable en la cabeza (Fig. 7C y 7D).

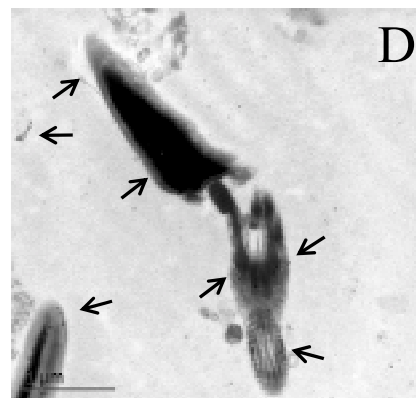
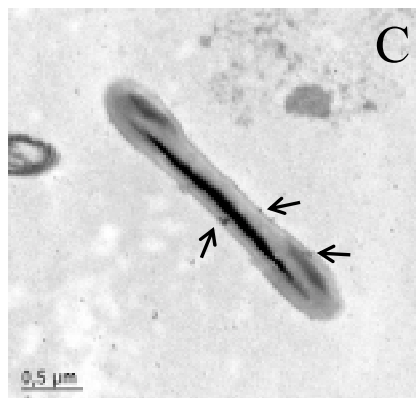
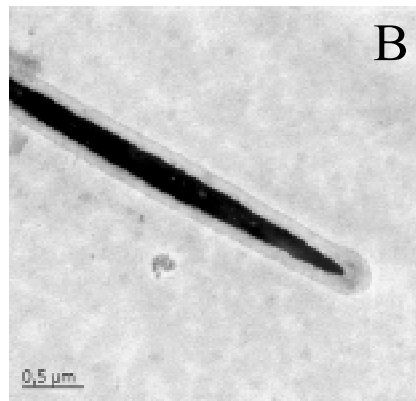
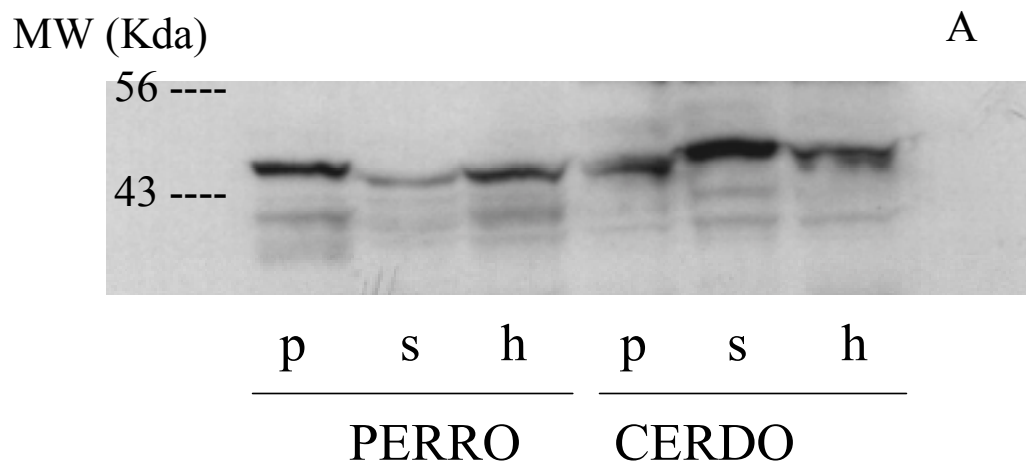


Figura 7

Figura 7. Expresión y localización del transportador de hexosas GLUT-3 en espermatozoides porcinos. A. Western blot contra el GLUT-3 en extractos de espermatozoides porcinos. La Figura muestra un Western blot representativo obtenido a partir de sobre nadantes (s), de sedimentos resuspendidos (p) y de extractos totales (h) provenientes de homogenizados caninos (DOG) y porcinos (BOAR) obtenidos a partir de eyaculados frescos. MW: Pesos moleculares. El número total de Western blots independientes realizados fue de 5. C-D: Localización mediante la técnica de inmunogold del GLUT-3 en espermatozoides de cerdo. La técnica del inmunogold se ha descrito en la correspondiente sección del apartado de Material y Métodos. Las flechas indican la presencia de una reacción positiva frente al anticuerpo anti-GLUT-3. Las barras indican el tamaño de la imagen. B: Imagen representativa de un control negativo de la técnica de inmunogold frente a cualquiera de las proteínas analizadas por esta técnica.

El análisis de Western blot realizado contra la hexoquinasa-I mostró la presencia de dos bandas específicas mayoritarias en espermatozoides de perro y cerdo, que correspondían con lo determinado en hígado de rata (Fig. 8A). Además, el tamaño de estas bandas concuerda con los datos publicados por otros autores para el enzima (Cárdenas et al., 1998), indicando que los espermatozoides de cerdo tienen una proteína compatible con la presencia de hexoquinasa-I.

La localización de la hexoquinasa-I mediante la técnica del inmunogold mostró una presencia escasa de reacción positiva, la cual se asoció principalmente a la membrana citoplasmática externa y el espacio submembranoso de la cabeza. Además, se observó la presencia de la hexoquinasa-I, de forma aislada y puntual, asociada a la membrana mitocondrial externa de la vaina mitocondrial, en la pieza intermedia (Fig. 8B y 8C).

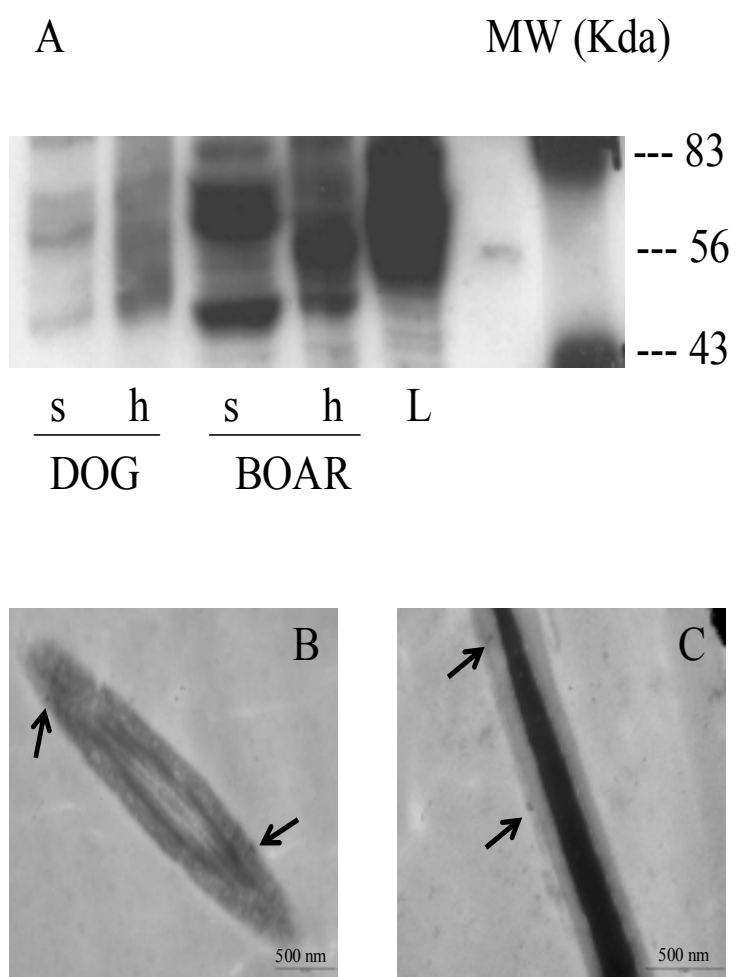


Figure 8

Figura 8. Expresión y localización de la hexoquinasa-1 en espermatozoides porcinos.

A. Western blot contra la hexoquinasa-1 en extractos de espermatozoides porcinos. La Figura muestra un Western blot representativo obtenido a partir de sobre nadantes (s), de sedimentos resuspendidos (p) y de extractos totales (h) provenientes de homogenizados caninos (DOG) y porcinos (BOAR) obtenidos a partir de eyaculados frescos. L: Homogenizados de hígado de rata. MW: Pesos moleculares. El número total de Western blots independientes realizados fue de 5. B-C: Localización mediante la técnica de inmunogold de la hexoquinasa-1 en espermatozoides porcinos. La técnica del inmunogold se ha descrito en la correspondiente sección del apartado de Material y Métodos. Las flechas indican la presencia de una reacción positiva frente al anticuerpo anti-hexoquinasa-1. Las barras indican el tamaño de la imagen.

3.9. Efecto de la incubación con monosacáridos sobre el patrón de fosforilación residuos de tirosina en extractos espermáticos de cerdo.

Tal y como se muestra en la Fig. 9, el patrón Tyr-Phos de los extractos espermáticos de cerdo mostró un diseño específicos, con una banda mayoritaria de aproximadamente 45 Kda. La incubación con cualquiera de los azúcares a una concentración de 10 mM no tuvo un efecto claro sobre la distribución de la bandas de este modelo, y sólo en algunos experimentos se pudo observar un ligero aumento en la intensidad de la banda de 45 Kda debido a la presencia de cualquiera de los monosacáridos utilizados (Fig. 9 y datos no mostrados).

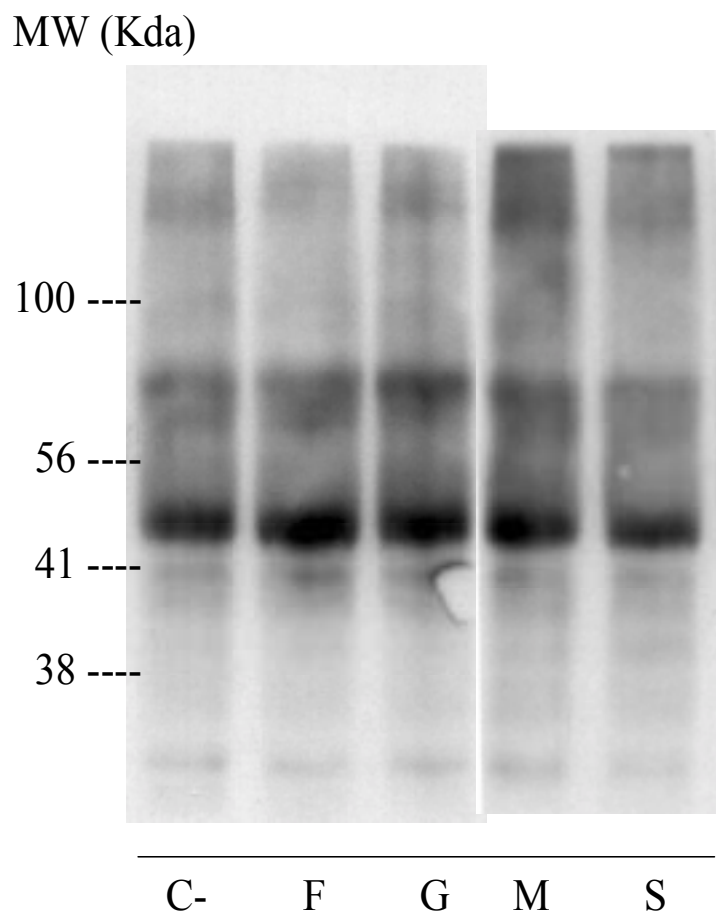


Figura 9

Figura 9. Patrones de fosforilación en residuos de tirosina en espermatozoides de cerdo incubados en presencia de monosacáridos. Los espermatozoides se incubaron durante 10 minutos en presencia de glucosa 10 mM, fructosa 10 mM, manosa 10 mM o sorbitol 10 mM. Tras la incubación, se llevó a cabo un análisis mediante Western blot del patrón de fosforilación, utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina de ratón. La cantidad de proteína total cargada en cada línea de electroforesis fue de 30 µg. La Figura muestra un resultado significativo de cinco experimentos diferentes realizados. C-: Espermatozoides incubados en ausencia de monosacáridos. G: Células incubadas con glucosa 10 mM. F: Espermatozoides incubados con fructosa 10 mM. M: Células incubadas en presencia de manosa 10 mM. S: Espermatozoides porcinos incubados con sorbitol 10 mM. MW: Pesos moleculares. El número total de experimentos diferentes realizados fue de 5.

4. DISCUSIÓN.

Nuestros resultados muestran claramente que las diferencias observadas en la utilización de la glucosa, la fructosa, la manosa y el sorbitol a través de la glucólisis en espermatozoides de cerdo, tiene su base primordial en ritmos diferentes de fosforilación de estos monosacáridos por parte de la maquinaria celular. De hecho, nuestros resultados señalan la presencia de una relación muy estrecha entre la sensibilidad a la fosforilación de un azúcar determinado y la formación extracelular de L-lactato a partir de este azúcar. En este sentido, considerando que la glucosa era la que mayor lactogenicidad mostraba entre todos los azúcares probados, su sensibilidad a la fosforilación a través de la actividad hexoquinasa también era la mayor, con diferencia. Por otro lado, el sorbitol el cual es utilizado a través de vía indirecta, que no tiene a la actividad hexoquinasa como su primer paso, induce a su vez un ritmo lactogénico más bajo. En este punto, sin embargo, hay que destacar el caso de la fructosa. En referencia a este monosacárido, nuestros resultados concuerdan con los de Jones y Connor (2000), que indicaron que los espermatozoides de cerdo utilizan la fructosa con menor eficiencia que la glucosa. Esto es debido a la confluencia de dos factores diferentes: Primero, la baja sensibilidad de la fructosa a la hexoquinasa cuando la comparamos con la glucosa. Segundo, la falta de una vía alternativa para entrar en la glucólisis, catalizada por una enzima fructoquinasa específica. Esta actividad fructoquinasa específica ha sido descrita en el hígado, y se caracteriza por fosforilar la fructosa, pero dando lugar como producto fructosa 1-fosfato en lugar de la esperable fructosa 6-fosfato. Resultados no publicados de nuestro laboratorio indican que los espermatozoides de cerdo no presentan niveles significativos de actividad fructoquinasa, y, de esta manera, la única vía por la que la fructosa puede entrar en la glucólisis en estas células es a través de la fosforilación mediada por hexoquinasa. Estos resultados

concordarían con otros concernientes a otras especies, como el perro, donde la fosforilación de la fructosa produce hexosas 6-fosfato en vez de fructosa 1-fosfato (Rigau et al., 2002), lo que indica que estos espermatozoides carecen igualmente de actividad fructoquinasa. Resumiendo, todos estos resultados indican que la proporción de fosforilación a través de la actividad hexoquinasa controla de manera eficiente la capacidad del espermatozoide de cerdo para utilizar los monosacáridos. Centrándonos en el tipo exacto de hexoquinasa presente en los espermatozoides de cerdo, la presencia de reacción positiva del anticuerpo anti hexoquinasa-I podría indicar que este tipo específico de hexoquinasa se encuentra presente en estas células. Resultados anteriores ya publicados muestran la existencia de una sola cinética de actividad hexoquinasa en espermatozoides porcinos, con un Km para la glucosa muy bajo, de aproximadamente 0,05 mM (Fernández-Novell et al., 2004). Esta cinética es similar a la descrita para la hexoquinasa-I. Así pues, la suma de los datos cinéticos e inmunológicos indica que la actividad hexoquinasa principal encontrada en los espermatozoides de cerdo podría ser hexoquinasa-I, o por lo menos ser una enzima estrechamente relacionada con ésta.

A pesar de la importancia de la hexoquinasa en el control de la glucólisis del espermatozoide de cerdo, resulta evidente que esta vía metabólica también es controlada por la modulación de, por lo menos otra actividad enzimática importante, como es la PK. En los espermatozoides de cerdo, la actividad PK muestra al menos dos aspectos notables. El primero es la gran sensibilidad a su substrato, ya que se refleja una actividad cercana al máximo a concentraciones muy bajas de PEP. El segundo es la activación dependiente de ADP de esta isozima espermática. Esta activación ligada al ADP no es única y, por ejemplo, la isozima hepática PK muestra la misma característica, sugiriendo así que la isozima espermática podría ser similar a la hepática. En todo caso, la suma de ambas características indica que el paso final de la glucólisis

en espermatozoides de cerdo es estrechamente dependiente de la proporción ADP/ATP intracelular, y, de esta manera, una caída en los niveles intracelulares de ATP induciría lógicamente un incremento inmediato del ADP, el cual a su vez activaría el ritmo glucolítico y aumentaría una nueva formación de ATP. Cuando el ATP recobrara niveles altos, se produciría una bajada simultánea de los niveles ADP, con la consecuente disminución en el ritmo glucolítico. Este fenómeno de retroalimentación podría estar en la base de la aparición espontánea de un ciclo de sustrato, en el cual se genera energía que se pierde inmediatamente, el cual es, curiosamente, típico en los espermatozoides mamíferos (Hammersted y Lardy, 1983). A pesar de la pérdida energética que supone el establecimiento de un ciclo de sustrato semejante, la rapidez e inmediatez que muestra el sistema de retroalimentación ligado a la PK permiten el mantenimiento de ciclo en un ritmo no peligrosos para las funciones espermáticas, a pesar del hecho de que los espermatozoides de mamífero raramente logran alcanzar la eficiencia estiquiométrica máxima en su ritmo de consumo de ATP (Hammersted y Lardy, 1983). Así, la combinación de un ritmo alto de glucólisis inducido por la gran sensibilidad a la hexoquinasa y piruvato quinasa respecto a un sustrato específico, junto con la dependencia al equilibrio ATP/ADP de la actividad PK y la tendencia al establecimiento de un ciclo de sustrato, indican con claridad que los espermatozoides de cerdo tiene un sistema muy sensible y rápido para controlar y ajustar sus requerimientos energéticos dependiendo, en primer lugar, de la cantidad total y del tipo específico de sustratos energéticos extracelulares disponibles, y en segundo lugar, del ambiente energético que rodea a la célula.

Los resultados observados con la técnica del inmunogold generan algunas consideraciones interesantes, que pueden servir para alcanzar una mejor comprensión de los mecanismos reguladores de utilización de las hexosas por los espermatozoides de

cerdo. En primer lugar, hay que destacar que el GLUT-3 puede localizarse tanto en la membrana citoplásmica interna como en la externa de la cabeza. Este resultado es llamativo, puesto que, en general, sólo los transportadores de membrana que se exterioricen podrán tener contacto con la glucosa extracelular, introduciéndola así dentro de la célula. Una posible explicación de este fenómeno sería que los GLUT-3 externos e internos pudieran representar formas funcionales diferentes de esta proteína. A este respecto, se ha demostrado que transportadores de hexosas GLUT-3 y GLUT-1 se localizan en dominios marcados por caveolina, y co-localizan con la proteína específica de caveólas caveolina-1, en espermátocitos y espermáticas de rata (Rauch et al., 2005). Hay que recordar que la caveolina-1 es una proteína que participa de manera muy activa en la formación de caveólas durante procesos celulares como la endocitosis (Montesano, 1982). Siguiendo este razonamiento, la presencia de GLUT-3 en una membrana interna podría ser consecuencia de una transposición hacia la membrana citoplásmica interna tras la unión del transportador con la glucosa. Esta transposición podría ser causada por un proceso de endocitosis, en el cual se formarían caveólas, ligadas a la presencia de caveolina-1, que contendrían el GLUT-3 unido a la glucosa. De esta manera, los GLUT-3 presentes en la membrana citoplásmica externa serían aquellos no unidos a una hexosa, mientras que los localizados internamente estarían unidos a monosacáridos. La transposición de receptores de la membrana celular hacia el interior de la célula a través de un mecanismo relacionado con la formación de caveólas no es raro y, por ejemplo, la activación del transportador de glucosa GLUT-4 en adipocitos parece seguir este mecanismo (Golberg et al., 1987). Por lo tanto, la existencia de un mecanismo similar podría estar presente en el espermatozoide porcino, como un sistema de optimizar el ritmo de entrada de glucosa en la célula.

Otro rasgo llamativo observado tras los resultados del inmunogold fue el hecho de que el GLUT-3 tenía una tendencia a mostrar una reacción específica contra su anticuerpo que provocaba la acumulación de partículas de oro en lugar de marcas de oro simples y aisladas. Este resultado sugiere que el GLUT 3 se localiza en la membrana celular de los espermatozoides formando agregados más que como moléculas aisladas. Este resultado contrasta con el observado en la hexoquinasa-I, la cual parece no estar distribuida en la célula siguiendo un patrón concreto. La formación de agregados de GLUT-3 podría hacer pensar en una zonación específica del metabolismo de las hexosas, puesto que la captación de monosacáridos sólo se puede producir en unos puntos concretos y específicos de la superficie del espermatozoide, allá donde los transportadores están agrupados. Por otra parte, esta hipótesis también podría explicarse a través de la anteriormente bosquejada, posible interrelación entre el GLUT-3 y la caveolina-1. Hay que recordar que la caveolina-1 marca la presencia en la membrana citoplásmica de zonas con propiedades físicas y químicas muy específicas, los dominios de caveolas. Estos dominios se caracterizan por presentar un contenido muy elevado en colesterol cuando los comparamos con el resto de la membrana celular (Smart, 1996). Las caveolas juegan un papel importante en la regulación de aspectos muy diferentes de la función de la membrana celular, tales como la regulación de diversas señales de transducción transmembranosa (Lisanti, et al., 1994a), la modulación de la captación de calcio (fujimoto, 1993), y la regulación de procesos de captación mediados por receptores, la endocitosis, la transcitosis dependiente de clatrina y la potocitosis (Montesano et al., 1982; Milici et al., 1987; Tran et al., 1987; Anderson, 1993). Teniendo en consideración este aspecto, se puede suponer que el metabolismo de las hexosas en espermatozoides de cerdo estaría separado en vías específicas para cada substrato, dependiendo de la relación más o menos específica que tuviera cada uno de

estos azúcares con los puntos de captación específicos para cada hexosa. Estos puntos específicos de captación estarían marcados por la presencia de diferentes transportadores hexosas, los cuales ocuparían una u otra posición específica en la membrana celular dependiendo de su relación con otras proteínas de anclaje, como podría ser la caveolina-1 respecto al GLUT-3. En este momento estamos llevando a cabo experimentos basados en la co-localización de proteínas, así como en la utilización de inhibidores metabólicos para la comprobación de esta hipótesis. Sin embargo la posibilidad de vías separadas y específicas dirigidas a obtener energía para funciones igualmente separadas y específicas en los espermatozoides de mamíferos podría explicar la gran complejidad en el control del metabolismo energético observada en estas células cuando se encuentran frente condiciones medio ambientales muy divergentes.

La incubación con los azúcares utilizados no modificó de manera clara en ningún caso el patrón específico de fosforilación en residuos de tirosina de los espermatozoides de cerdo. Este resultado difiere de lo observado en otras especies, como el perro, en donde la glucosa y la fructosa no solo indujeron un aumento notable en la intensidad de las bandas de Tyr-Phos, si no también la aparición de bandas específicas de fosforilación para cada azúcar (Rigau et al., 2002). Estos resultados indican que el papel de moduladores funcionales específicos que los monosacáridos tienen en especies como el perro no parece tan claro en el cerdo, ya que una modulación de funcionalidad específica de cada azúcar induciría con mucha probabilidad cambios igualmente específicos en el patrón Tyr-Phos. Por supuesto, este resultado no invalidaría la existencia de un papel de moduladores de función específicos de azúcares como la glucosa o la fructosa, puesto que, por ejemplo, estos monosacáridos podrían actuar también a través de la modificaciones el estado de fosforilación muy pocas proteínas,

las cuales serían indetectables en el Western blot. Sin embargo, ya que estos cambios específicos son mucho más fáciles de descubrir en el perro, es razonable suponer que el efecto de modulación específico de las azúcares es más importante en especies como el perro que en el cerdo. Estas diferencias entre espermatozoides de mamíferos diferentes, junto con otras ya descritas, relacionadas con la gestión del metabolismo energético en especies como el perro, el cerdo, el toro y el ratón (Riimenspoel y Caputo, 1966; Hammersted y Lardy, 1983; Jones y Connors, 2000; Rigau et al., 2002; Marin et al., 2003), indican con claridad que los espermatozoides de mamífero no deberían ser considerados como células con un comportamiento homogéneo, por lo menos desde el punto de vista funcional. Es evidente que cada especie de mamífero tiene un diseño funcional específico y diferente de sus espermatozoides, relacionado seguramente con las diferentes estrategias evolutivas que cada especie ha desarrollado para lograr la fecundación “in vivo”. De esta manera, las características funcionales de los espermatozoides en especies como el perro, el cual tiene que mantener sus espermatozoides en el tracto genital de la hembra durante largos periodos (Feldman y Nelson, 1987), es muy diferente a otros como el cerdo, con una vida más corta (Hunter, 1981).

En conclusión, el uso energético diferente de los monosacáridos por parte de los espermatozoides de cerdo se basa principalmente en la sensibilidad diferente que la actividad hexoquinasa espermática presenta frente a cada azúcar. Así, la captación y fosforilación de azúcares son el primer paso importante en la regulación de metabolismo de las hexosas. El segundo paso importante es modulado por la actividad PK, que actúa en dependencia del equilibrio intracelular entre los niveles de ATP y de ADP. Por lo tanto, el ritmo metabólico del espermatozoide de cerdo es regulado, primero por el tipo específico de azúcar que la célula encuentra en el ambiente y, segundo por los niveles

intracelulares de energía. Finalmente, nuestros resultados sugieren que la glucólisis se inicia sólo en algunos puntos concretos de la célula, dependiendo de la presencia de un transportador de hexosa específico y de la relación de estos transportadores tengan con otras moléculas fijadoras en la membrana, como la caveolina-1. En este sentido, la obtención y utilización final de energía podría ser extremadamente dependiente de la vía específica utilizada para la captación de cada substrato por parte de los espermatozoides de cerdo. Todos estos datos tienen que ser tomado en consideración al diseñar nuevos sistemas de almacenamiento y conservación de los espermatozoides, ya que solo un conocimiento cuidadoso de las características de la funcionalidad específica de estas células permitirá un óptimo resultado en su manejo.

5. AGRADECIMIENTOS.

Agradecemos al Sr. Chuck Simmons su valiosa ayuda en la preparación de la versión inglesa de este manuscrito, y a Mercè Martí y Francisca Cardoso del “Servei de Microscopia Electronica” (Universidad Autónoma de Barcelona) por su valiosa dirección en la aplicación de la técnica inmunogold.

6. RERERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albarracín JL, Fernández-Novell JM, Ballester J, Rauch MC, Quintero-Moreno A, Peña A, Mogas T, Rigau T, Yáñez A, Guinovart JJ, Slebe JC, Concha II and Rodríguez-Gil JE. 2004. Gluconeogenesis-linked glycogen metabolism is important in the achievement of in vitro capacitation of dog spermatozoa in a medium without glucose. *Biol. Reprod.* 71: 1437-1445.
- Anderson RGW. 1993. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10909-10913.

- Ballester J, Fernández-Novell JM, Rutllant J, García-Rocha M, Palomo MJ, Mogas T, Peña A, Rigau T, Guinovart JJ and Rodríguez-Gil JE. 2000. Evidence for a functional glycogen metabolism in mature mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Develop* 56: 207-219.
- Bamba K. 1988. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology* 29: 1245-1251.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Burnett WN. 1981. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated proteins. *J Anal Biochem* 112:195-203.
- Cárdenas ML, Cornish-Bowden A, Ureta T. 1998. Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim Biophys Acta* 1401:242-264.
- Dykstra MJ. 1992. Staining Methods for Semithins and Ultrathins. In: Dykstra, MJ, ed *Biological Electron Microscopy. Theory, Techniques, and Troubleshooting*. New York: Plenum Press. 175-180.
- Feldman EC and Nelson RW. 1987. Fertilization . In: Pedersen E, ed. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. Philadelphia: WB Saunders Co. 420-421.
- Feliu JE, Hue L and Hers HG. 1977. Regulation in vitro and in vivo of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent inactivation of rat liver pyruvate kinase type L. *Eur J Biochem* 81: 609-617
- Fernández-Novell JM, Ballester J, Medrano A, Otaegui PJ, Rigau T, Guinovart JJ and Rodríguez-Gil JE. 2004. The presence of a high-Km hexokinase activity in dog, but not in boar, sperm. *FEBS Lett* 570: 211-216.

- Folgero T, Bertheussen K, Lindal S, Torbergesen T and Oian P. 1993. Mitochondrial disease and reduced sperm motility. *Human Reprod* 8: 1863-1868.
- Fraser LR and Herod JE. 1990. Expression of capacitation-dependent changes in chlortetracycline fluorescence patterns in mouse spermatozoa requires a suitable glycosylable substrate. *J Reprod Fertil* 88: 611-621.
- Fujimoto T. 1993. Calcium pump of the plasma membrane is located in caveolae. *J Cell Biol* 120: 1147-1157.
- Goldberg RI, Smith RM and Jarett L. 1987. Insulin and alpha-2-macroglobulin-methylamine undergo endocytosis by different mechanisms in rat adipocytes. I: comparison of cell surface events. *J Cell Physiol* 133: 203-212.
- Halangk W, Bohnenback R and Kunz W. 1985. Interdependence of mitochondrial ATP production and extramitochondrial ATP utilization in intact spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 808: 316-322.
- Hammersted RH and Lardy HA. 1983. The effects of substrate cycling on the ATP yield of sperm glycolysis. *J Biol Chem* 258: 8759-8768.
- Hunter RHF. 1982. Interrelationships between spermatozoa, the female reproductive tract and the eggs investments. In: Cole DJA and Foxcroft GR, eds. *Control of Pig Reproduction*. London, Butterworth Scientific, 49-64.
- Jones AR, Chantrill LA, Cokinakis A. 1992. Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa. *J Reprod Fertil* 94:129-134.
- Jones AR. 1997. Metabolism of lactate by mature boar spermatozoa. *Reprod Fertil Develop* 9:227-232.
- Jones AR, Connor DE. 2000. Fructose metabolism by mature boar spermatozoa. *Reprod Fertil Develop* 12:355-359.

- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lambrecht M and Transtschold D. 1984. ATP determination with hexokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie. p 543-551.
- Lehninger AL, Nelson DL and Cox MM. 1993. Feeder pathways of glycolysis. In: Lehninger AL, Nelson DL and Cox MM, eds. *Principles of Biochemistry*, 2^d Edition. New York, Worth Publishers, 422-423.
- Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, Cook RF and Sargiacomo M. 1994. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol* 126: 111-126.
- Marín S, Chiang K, Bassilian S, Lee W-N P, Boros LG, Fernández-Novell JM, Centelles JJ, Medrano A, Rodríguez-Gil JE, Cascante M. 2003. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Lett* 554:342-346.
- Michal G. 1984. Glucose 6-phosphate. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie. p 191-197.
- Milici AJ, Watrous NE, Stukenbrok H and Palade GE. 1987. Transcytosis of albumin in capillary endothelium. *J Cell Biol* 105: 2603-2612.
- Montesano R, Roth J, Robert A and Orci L. 1982. Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. *Nature* 296: 651-653.
- Mukai C and Okuno M. 2004. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod* 71: 540-547.

- Newsholme EA and Leech AR. 1983. Sorbitol. In: Newsholme EA and Leech AR, eds. Biochemistry for the Medical Sciences. Chciester, John Wiley & sons, 470-471.
- Noll, F. 1984. L-lactate. In: Bergmeyer HU, editor. Methods of Enzymatic Analysis. Weinheim: Verlag Chemie. p 582-588.
- Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. 2004. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. Theriogenology 61:673-690.
- Rauch MC, Ocampo ME, Bohle J, Amthauer R, Yáñez A, Rodríguez-Gil JE, Slebe JC, reyes JG and Concha II. 2005. Hexose transporters GLUT1 and GLUT3 are colocalized with hexokinase I in caveolae microdomains of rat spermatogenic cells. Submitted.
- Rawn JD. 1983. Hexokinase. In: Rawn JD, ed. Biochemistry. New York, Harper & Row Publishers Inc, 557-558.
- Rigau T, Rivera M, Palomo MJ, Fernández-Novell JM, Mogas T, Ballester J, Peña A, Otaegui PJ, Guinovart JJ, Rodríguez-Gil JE. 2002. Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. Reproduction 123:579-591.
- Rikmenspoel R and Caputo R. 1966. The Michaelis-Menten constant for fructose and glucose of hexokinase in bull spermatozoa. J Reprod Fertil 12: 437-444.
- Rogers BJ and Perreault SD. 1990. Importance of glycosylable substrates for in vitro capacitation of human spermatozoa. Biol Reprod 43: 1064-1069.
- Ruíz-Pesini E, Díez C, Lapena AC, Pérez-Martos A, Montoya J, Álvarez E, Arenas J and López-Pérez M. 1998. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. Clin Chem 44: 1616-1620.

Smart EJ, Ying Y, Donzell WC and Anderson RGW. 1996. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* 271: 29427-29435.

Tran D, Carpentier JL, Sawano F, Gorden P and Orci L. 1987. Ligands internalized through coated or noncoated invaginations follow a common intracellular pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7957-7961.

CAPÍTULO IV

UTILIZATION OF CITRATE AND LACTATE THROUGH A LACTATE DEHYDROGENASE AND ATP-REGULATED PATHWAY IN BOAR SPERMATOZOA

Running head: Citrate/lactate metabolism in boar sperm

ANTONIO MEDRANO^{*}, JOSEP M^a. FERNÁNDEZ-NOVELL[†], LAURA RAMIÓ^{*},
JUAN ALVAREZ[#], ERWIN GOLDBERG[§], M^a. MONTSERRAT RIVERA^{*}, JOAN J.
GUINOVART[†], TERESA RIGAU^{*} AND JOAN E. RODRÍGUEZ-GIL^{*}

From the ^{}Unit of Animal Reproduction. Department of Animal Medicine and Surgery, School of Veterinary Medicine, Autonomous University of Barcelona, Bellaterra, Spain; the [†]Department of Biochemistry and Molecular Biology and IRBB, Barcelona Science Park, University of Barcelona, Barcelona, Spain; the [#]Centro de Infertilidad Masculina ANDROGEN, La Coruña, Spain and Harvard Medical School, Boston, MA; and the [§]Department of Biochemistry, Molecular Biology and Cell Biology, Northwestern University, 2205 Tech Drive, Evanston, IL*

Supported by Grant AGL2001-2568 from the Ministry of Science and Technology, Spain.

Correspondence to: Joan E. Rodríguez-Gil. Unitat de Reproducció Animal. Departament de Medicina i Cirurgia Animals. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona. E-08193 Bellaterra, Spain.

Phone: 34-935811045

E-mail: juanenrique.rodriguez@uab.es

To be submitted

ABSTRACT: Incubation of boar spermatozoa in Krebs-Ringer-Henseleit medium with either 10 mM lactate or 10 mM citrate induced in both cases a fast and robust increase in the intracellular levels of ATP, which reached a peak after 30 sec of incubation. Utilization of both citrate and lactate resulted in the export of CO₂ to the extracellular medium indicating that both substrates were metabolized through the Krebs cycle. Incubation with citrate resulted in the generation of extracellular lactate, which was inhibited in the presence of phenylacetic acid. This indicates that lactate is produced through the pyruvate carboxylase step. In addition, there was also a significant increase in tyrosine phosphorylation induced by both citrate and lactate. Boar sperm has a sperm-specific isoform of lactate dehydrogenase (LDH), mainly located in the principal piece of the tail. Kinetic studies showed that boar sperm has at least two distinct LDH activities. The major activity (with an estimated Km of 0.51mM) was located in the supernatants of sperm extracts. The minor LDH activity (with an estimated Km of 5.9 mM) was associated with the non-soluble fraction of sperm extracts. Our results indicate that boar sperm efficiently metabolize citrate and lactate through a metabolic pathway regulated by LDH.

Key words: Boar spermatozoa. Citrate. Lactate. LDH. Energy metabolism

Acknowledgments: We thank Mr. Chuck Simmons for his valuable assistance in preparing the English version of the manuscript and Mrs. Raquel García-Olivas (Serveis Científico-Tècnics; Barcelona Science Park, University of Barcelona) for her assistance in obtaining confocal images.

1. INTRODUCTION

Following ejaculation, mammalian spermatozoa require a high energy supply. Different metabolic substrates can be utilized by sperm to maintain their energy requirements. Several authors have reported that boar sperm obtain energy, not only from glucose and fructose (Jones, 1997; Jones and Connor, 2000; Marín et al., 2003), but also from non-hexose compounds, such as lactate (Jones, 1997), pyruvate (Jones, 1997) and glycerol (Jones et al., 1992). The ability of boar sperm to utilize these non-hexose substrates could allow them to increase their survival rate in conditions where monosaccharide supply is limited. This metabolic strategy could play an important role in the fertilizing ability of boar spermatozoa.

However, the utilization of energy substrates other than monosaccharides by boar sperm is not well understood. It is worth noting that boar sperm display high glycolytic rates (Marín et al., 2003). Whereas some metabolites, such as glycerol, can be utilized through its incorporation into the glycolytic pathway, others, such as lactate, pyruvate and citrate, are consumed by pathways other than glycolysis, such as the Krebs cycle. Nevertheless, metabolomic studies have revealed that boar spermatozoa from fresh ejaculates incubated in the presence of glucose have very low Krebs cycle flux rates (Marín et al., 2003). This poses the question as to how boar spermatozoa from fresh ejaculates utilize non-monosaccharide substrates as energy sources: either by an activation of the Krebs cycle in the absence of sugars or by the entry of these metabolites in metabolic pathways other than glycolysis or the Krebs cycle. This is an important question, since a better understanding of these pathways could significantly improve the strategies used for boar sperm cryostorage and also to extend the motile lifetime of sperm in the female genital tract.

The main aim of this study was to determine the efficiency of the utilization of two non-monosaccharide energy substrates, citrate and lactate by boar sperm obtained from fresh ejaculates. For this purpose, boar sperm were incubated in media containing increasing concentrations of both substrates and their metabolic utilization monitored using standard markers of energy metabolism, such as the rate of formation of extracellular lactate and CO₂ and the intracellular levels of glucose 6-phosphate (G 6-P), glycogen and ATP. Moreover, we determined the enzyme kinetics of total lactate dehydrogenase (LDH) activity, as well as the subcellular localization of sperm-specific LDH, since this enzymatic activity will control the entry of substrates into the Krebs cycle and, subsequently, into other putative metabolic pathways. Our results show that both citrate and lactate are utilized by boar sperm from fresh ejaculates through their metabolization by the Krebs cycle, although citrate is also utilized by another pathway that produces lactate as a subproduct. The energy utilization of both substrates induces the formation of enough intracellular ATP levels to maintain motility and activate sperm tyrosine phosphorylation (Tyr-Phos). In conclusion, one of the key controlling steps of citrate and lactate utilization seems to be the modulation of LDH activity, which appears to have a complex behavior, with mixed activities and a low sensitivity range for lactate concentration.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Semen Collection and Processing

Boar semen was obtained from 15 healthy, sexually mature boars from a commercial farm (Servicios Genéticos Porcinos, S.L.; Roda de Ter, Spain). Boars were 6 White Belgium, 5 Large White x Pietrain, 2 Pietrain and 2 Landrace, which were 2-3 years old. The sperm-rich fraction of the ejaculates was manually collected and immediately

placed in a water-bath at 37°C. The semen was immediately diluted to a concentration of 2×10^7 spermatozoa/mL in a commercial extender for refrigerated semen (MR-A extender. Kubus, S.A.; Majadahonda, Spain) and distributed in 100-mL commercial AI doses. The concentrations of these doses were calculated by using a hemocytometer cell chamber. Four of the obtained 100-mL doses were placed in a portable refrigerator at 16°C for approximately 90 min, which was the time required to arrive at the laboratory. Here, samples were centrifuged at 600 $\times g$ for 10 min at 16°C in a temperature-controlled centrifuge and were then resuspended in 50 mL of a Krebs-Ringer-Henseleit medium without sugars at 16°C (KRH- medium; pH 7.4). The sperm was again centrifuged at 600 $\times g$ for 10 min at 16°C and sedimented cells were again resuspended in 50 mL of KRH- medium. The centrifugation-resuspension step was repeated once more, in order to eliminate any remains of both seminal plasma and commercial extender. The final, 50-mL sperm suspension was again centrifuged at 600 $\times g$ for 10 min at 16°C and cells were finally resuspended in 2 mL of KRH- medium. At this moment, the resuspended cells of all 4 AI doses were pooled, and they were further equally distributed in open vials and incubated with continuous shaking at 37°C with or without additions of citrate and lactate at the appropriate concentrations to the medium. When stated, aliquots of the incubated sperm were taken and treated depending on the required analysis. These treatments were the following:

To determine the percentages of viability and altered acrosomes, 30- μ L aliquots were taken and immediately stained by the Eosin-Nigrosin method (Bamba, 1988), following Quintero-Moreno et al. (2004). The percentages of both viability and altered acrosomes were established after counting 200-300 spermatozoa in each sample.

To determine the extracellular levels of both lactate and glucose, as well as the intracellular content of G 6-P, glycogen and ATP, 250- μ L aliquots of the sperm

suspensions were taken and immediately centrifuged at 1000 xg for 1 min, and the supernatants and cellular pellets obtained were separated and frozen immediately in liquid N_2 . Supernatants were utilized to determine lactate and glucose extracellular levels, whereas pellets were treated to determine G 6-P, glycogen and ATP content. Samples were stored at $-80^{\circ}C$ until analysis. In all cases, a separate 10- μ L aliquot was also collected for analysis of the total protein content of the sample.

For determination of G 6-P and ATP content, frozen cellular pellets were homogenized by sonication in 300 μ L of 10% (v/v) ice-cold $HClO_4$. Homogenates were centrifuged at 10,000 xg for 15 min at $4^{\circ}C$, and the resultant supernatants were neutralized with 5 M K_2CO_3 before analysis.

For determination of glycogen content, frozen pellets were homogenized by sonication with 300 μ L of ice-cold 30% (w/v) KOH and heated at $100^{\circ}C$ for 15 min. The obtained extracts were utilized for the analysis.

Whole, single, fresh AI boar sperm doses were centrifuged immediately at 600 xg for 10 min at $16^{\circ}C$ to determine the total lactate dehydrogenase activity. The sperm pellet was resuspended with 50 mL of KRH- medium, and the centrifugation-resuspension step was repeated twice more in order to completely eliminate all substances included in the medium that could affect kinetic properties of sperm lactate dehydrogenases. The final, 50-mL sperm suspension was again centrifuged at 600 xg for 10 min at $16^{\circ}C$. After this, supernatant was discarded, and the resultant cellular pellet was homogenized by sonication with 500 μ L of an ice-cold 10 mM Tris/HCl buffer (pH 7.4) containing 150 mM KCl, 0.6 M sucrose, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM benzamidine, 25 μ g/mL leupeptin and 50 mM β -mercaptoethanol (homogenation buffer). Homogenized samples were centrifuged at 10,000 xg for 15 min at $4^{\circ}C$. Lactate dehydrogenase activity was measured in the resultant supernatants and in the pellets,

which were washed once in 500 μL of homogenation buffer in order to eliminate any remaining activity associated with the supernatant. Finally, the washed pellets were resuspended in 250 μL of homogenation buffer. Again, 10- μL aliquots of both supernatants and resuspended pellets were taken to determine the total protein content of the samples.

For determination of the rate of CO_2 production, 4 pooled AI doses were processed as above, and 500- μL aliquots of the final sperm suspension in the KRH- medium were incubated for 60 min at 37°C in stoppered vials in the presence of increasing concentrations of both $[\text{U}^{14}\text{C}]\text{lactate}$ or $[\text{1-5}^{14}\text{C}]\text{ citrate}$. The total radioactivity count added to each vial was about 640,000 in the case of $[\text{U}^{14}\text{C}]\text{ lactate}$ and about 430,000 cpm in the case of $[\text{1-5}^{14}\text{C}]\text{ citrate}$. At the end of the incubations, a piece of filter paper soaked with 200 μL phenethylamine was placed into each of the vials, avoiding direct contact with the suspension. After the addition of 85 μL of 10% (v/v) HClO_4 to the sperm suspension, the vials were gently shaken for another 30 min, and the radioactivity in the filter paper was counted. Before addition of the radioactive material, a 10- μL aliquot of the cell suspension was taken to determine total protein content.

2.2. Analytical Procedures

The G 6-P levels were determined enzymatically as in Michal (1984), and following the modifications described in Rigau et al. (2002), in order to increase the precision of the analysis.

The concentrations of L-lactate (Noll, 1984), glycogen (Ballester et al., 2000) and ATP (Lambrecht and Trantschold, 1984) and the lactate dehydrogenase activity (Wahlfeld, 1984) were determined by the cited enzymatic techniques. Extracellular glucose levels were determined enzymically by using a commercial kit (GlucoQuant; Boehringer Mannheim; Mannheim, Germany). All of these techniques, as well as that of

G 6-P, were adapted to a Cobas Bio autoanalyzer (Roche Biomedical; Basel, Switzerland).

Total protein content of the samples was determined by the Bradford method (Bradford, 1976), using a commercial kit (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA)

2.3. Immunological Techniques

Western blot analyses were performed on boar spermatozoa that had been homogenized by sonication in ice-cold 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 1% (w/v) dodecyl sodium sulphate (SDS) and 1M Na₂VO₄ (proportion 1:5, v/v) to avoid changes in the overall phosphorylation status of the homogenates (Western buffer). The samples were briefly boiled and were then centrifuged at 10,000 xg for 15 min at 4°C. Western blot analysis was performed in both the resultant supernatants and the pellets, which were washed once in 500 µL of Western buffer in order to eliminate any remaining positive reaction associated with the supernatant. Finally, the washed pellets were resuspended in 250 µL of Western buffer, and the subsequent resuspended pellets were also utilized for the analysis. Finally, sperm homogenized in the presence of Western buffer was also utilized without separation between supernatants and pellets by centrifugation. The immunological analysis of the resultant total homogenates, supernatants and resuspended pellets was based on SDS gel electrophoresis (Laemmli, 1970), followed by transfer to nitrocellulose (Burnett, 1981). The transferred samples were tested with the antibodies at a dilution (v/v) of 1:1,000. Immunoreactive proteins were tested using peroxidase-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Amersham; Little Chalfont, United Kingdom) and the reaction was developed with an ECL-Plus detection system (Amersham).

Immunocytochemistry was performed with sperm cells seeded onto gelatin-coated glass coverslips (10 mm x 10 mm). The spermatozoa were washed with phosphate-

buffered saline (PBS; pH 7.4) and were fixed for 30 min in PBS containing 4% (w/v) paraformaldehyde. The fixed samples were incubated with 1 mg/mL NaBH₄ in order to eliminate autofluorescence, and blocked in 3% (w/v) bovine serum albumin in PBS. The spermatozoa were then incubated with the anti-sperm lactate dehydrogenase antibody at a dilution of 1:500 (v/v) for 5 h at 15°C-17°C, washed with PBS and treated with a tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)-conjugated swine anti-rabbit immunoglobulin (Dako; Glostrup, Denmark). Fluorescent images were obtained using a Leica TCS 4D confocal scanning laser microscope (Leica Lasertechnik; Heidelberg, Germany), adapted to an inverted Leitz DMIRBE microscope and an x63 (NA 1.4 oil) Leitz Plan-Apo Lens (Leitz; Stuttgart, Germany). The light source was an argon/krypton laser.

Dog spermatozoa used as control in some Western blot analyses were obtained from healthy, sexually mature Beagle dogs from the “Servei d’Estabulari” of the Autonomous University of Barcelona. These samples were processed in the same form as those described above for boar spermatozoa.

2.4. Statistical Analyses

When stated, the putative significance of the differences was calculated by either two-way ANOVA (in non-paired data) or by the Student’s test (in paired results).

2.5. Materials

Human anti-sperm-specific lactate dehydrogenase antibody was synthesized in the laboratory of Dr. Goldberg. Anti-mouse phosphotyrosine (PY20) was from Transduction Laboratories (Lexington, KY). [U¹⁴C] lactate and [1-5¹⁴C] citrate were purchased from Amersham. Citrate and L-lactate were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All other reagents were of analytical grade and were supplied by

Sigma (St. Louis, MO), Merck, BioRad (Hercules, CA) and EMS (Fort Washington, PA).

3. RESULTS

3.1. Effect of Incubation with Citrate and Lactate in Percent Sperm Viability and Acrosomal Status

Incubation of boar spermatozoa in a medium devoid of energy substrates resulted in a progressive decrease in sperm viability from 78% at the start of incubation to 68% after 60 min of incubation (Figure 1A). Addition of 10 mM citrate and 10 mM lactate to the medium did not modify this pattern (Figure 1A). Furthermore, sperm viability did not change after 30 min incubation with increasing concentrations of both citrate and lactate (Figure 1B).

In contrast, there was a time-dependent increase in the percent of sperm with acrosomal alteration after the incubation in medium devoid of energy sources. Acrosomal alteration increased from 14% at the start of incubation to 22% after 60 min of incubation (Figure 1C). Addition of 10 mM citrate and 10 mM lactate did not significantly modify this increase (Figure 1C). Incubation of boar spermatozoa for 30 min in the presence of increasing concentrations of citrate and lactate did not show any significant effect on acrosomal status (Figure 1D).

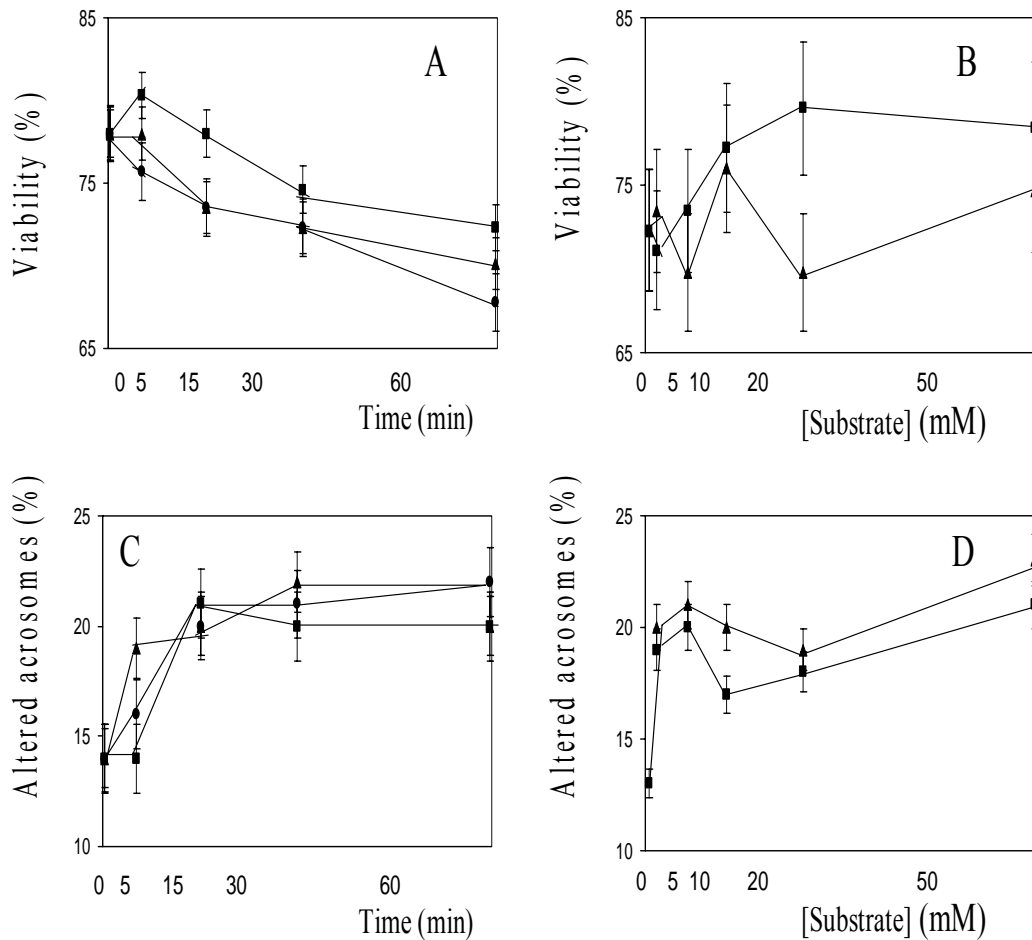


Figure 1

Figure 1. Time- and concentration-dependent effects of citrate and L-lactate on the percentages of viability and altered acrosomes in fresh boar spermatozoa. A,C: Spermatozoa were incubated in the absence (●) or presence of 10 mM citrate (■) or 10 mM L-lactate (▲) and, at the indicated times, aliquots were taken to determine the percentages of viability (A) and altered acrosomes (C). B,D: Spermatozoa were incubated for 30 min with increasing concentrations of citrate (■) or L-lactate (▲) and aliquots were taken to determine the percentages of viability (B) and altered acrosomes (D). Results shown are means±S.E.M. for 8 separate experiments.

3.2. Effects of Incubation with Citrate in the Extracellular L-Lactate Levels

Incubation of boar sperm in a medium devoid of energy substrates resulted in a very low increase in extracellular L-lactate levels, which went from 0.21 ± 0.01 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein at the start of the incubation to 0.30 ± 0.01 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein after 60 min of incubation (Figure 2). Addition of 10 mM citrate induced a significant increase in extracellular L-lactate levels, which reached values of 2.64 ± 0.07 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein after 30 min and of 3.16 ± 0.03 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein after 60 min of incubation (Figure 2A). This effect was dependent on the concentration of citrate used, since the maximal effect was obtained after incubation with 10 mM citrate. It is noteworthy that citrate levels of 20 mM (2.18 ± 0.04 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein) and 50 mM (1.17 ± 0.02 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein) induced L-lactate levels after 60 min of incubation that were clearly lower than those obtained with 10 mM citrate (Figure 2B), thus indicating a possible toxic effect of citrate at concentrations above 10 mM on boar spermatozoa. On the other hand, addition of 10 mM phenylacetic acid (PAA), a specific inhibitor of the pyruvate carboxylase anaplerotic step (Bahl et al., 1997), to the medium almost completely prevented the citrate-induced increase in extracellular L-lactate levels after 60 min of incubation without a significant change in the percentages of viability and altered acrosomes (Figure 2A and data not shown).

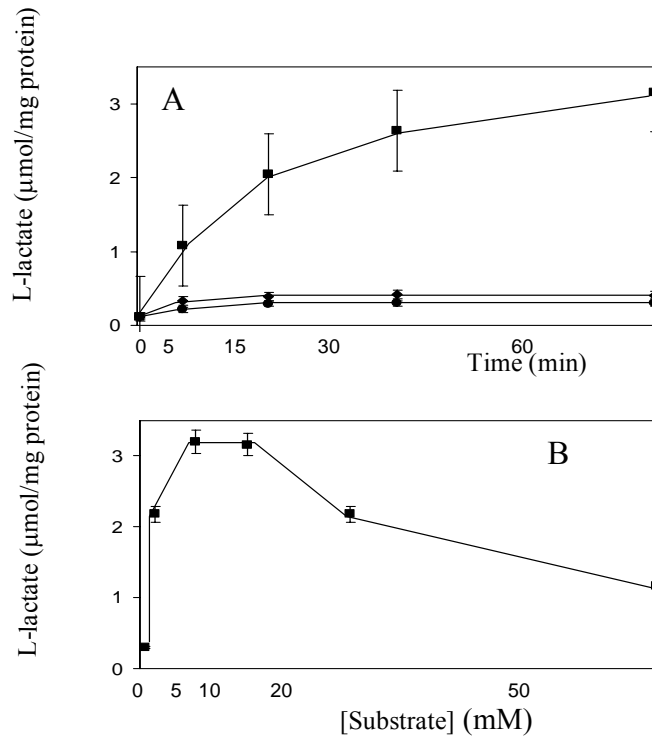


Figure 2

Figure 2. Time- and concentration-dependent effects of citrate on the extracellular L-lactate levels in fresh boar spermatozoa. A: Spermatozoa were incubated in the absence of any energy substrate (●) or in the presence of 10 mM citrate (■). Furthermore, cells were also incubated with 10 mM citrate and 10 mM phenylacetic acid together (◆). At the indicated times, aliquots were taken to determine the extracellular levels of L-lactate. B: Spermatozoa were incubated for 60 min with increasing concentrations of citrate (■) and aliquots were taken to determine the extracellular L-lactate levels. Results shown are means±S.E.M. for 8 separate experiments.

3.3. Effects of Incubation with L-Lactate and Citrate in the Intracellular Levels of Glucose 6-Phosphate and Glycogen and in the Extracellular Glucose Levels

Boar sperm showed no detectable levels of G 6-P under any of the experimental conditions used in this study. Likewise, extracellular glucose was not detected under any of the experimental conditions (data not shown). On the other hand, sperm from fresh semen samples showed intracellular glycogen values of 56.2 ± 3.5 nmol glucose/mg protein (Figure 3A). These values decreased to 41.8 ± 1.1 nmol glucose/mg protein after 60 min of incubation in a medium without energy sources. Addition of either 10 mM citrate or 10 mM lactate counteracted this decrease at the longest incubation times, with glycogen levels reaching values of 57.3 ± 3.9 nmol glucose/mg protein and 54.7 ± 5.4 nmol/mg protein after 60 min of incubation with citrate and lactate, respectively (Figure 3A). Moreover, the effects of both citrate and lactate on intracellular glycogen levels were also dose-dependent. Thus, maximal effect of both substrates was reached after incubation for 60 min at a concentration of either 50 mM citrate or 50 mM lactate (Figure3B).

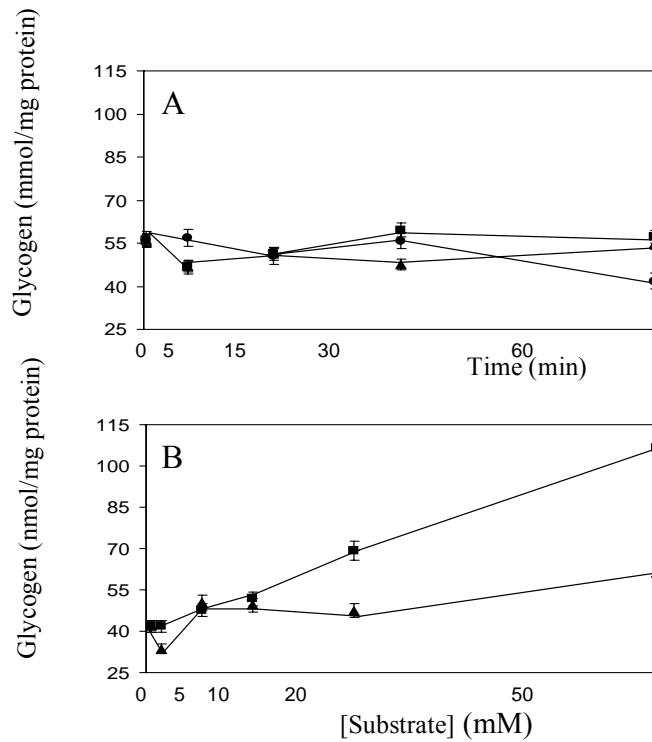


Figure 3

Figure 3. Time- and concentration-dependent effects of citrate and L-lactate on the intracellular glycogen content in fresh boar spermatozoa. A: Spermatozoa were incubated in the absence (●) or presence of 10 mM citrate (■) or 10 mM L-lactate (▲) and, at the indicated times, aliquots were taken to determine the intracellular glycogen levels. B: Spermatozoa were incubated for 60 min with increasing concentrations of citrate (■) or L-lactate (▲) and aliquots were taken to determine the intracellular concentration of glycogen. Results shown are means±S.E.M. for 8 separate experiments.

3.4. Effects of the Incubation with L-Lactate and Citrate in the Intracellular Levels of ATP

Intracellular levels of ATP in boar sperm were highly sensitive to the lack of external energy sources. As shown in Figure 4A, ATP levels decreased from 9.2 ± 1.2 nmol/mg protein at the start of incubation to 1.6 ± 0.4 nmol/mg protein after 60 min of incubation in medium without citrate or lactate. Addition of both substrates induced a high and fast increase in ATP levels, which reached maximal values after only 30 sec of incubation with either 10 mM citrate or 10 mM lactate (Figure 4A). After this time period, ATP levels progressively decreased, reaching values of 10.9 ± 2.1 nmol/mg protein and 9.3 ± 2.1 nmol/mg protein after 60 min of incubation with citrate or lactate, respectively (Figure 4A). It is noteworthy that the ATP values after 60 min of incubation with both citrate and lactate were much greater than those obtained after 60 min of incubation without energy substrates.

There were also dose-dependent effects of citrate and lactate on intracellular ATP levels. ATP concentration after 15 min of incubation increased with an increase in citrate levels (Figure 4B). On the other hand, in the presence of 50 mM lactate ATP values were lower (10.0 ± 0.8 nmol/mg protein) than those obtained with 10 mM lactate (13.4 ± 0.7 nmol/mg protein, see Figure 4B).

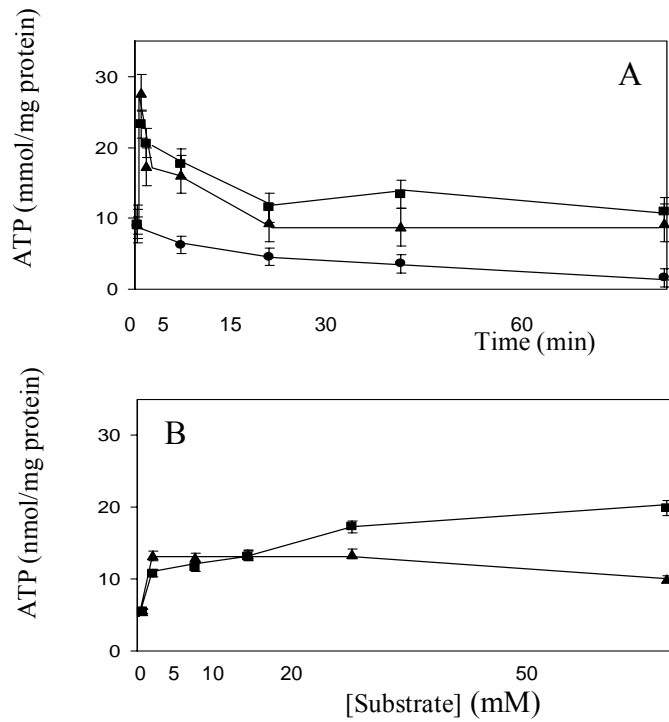


Figure 4

Figure 4. Time- and concentration-dependent effects of citrate and L-lactate on the intracellular ATP levels in fresh boar spermatozoa. A: Spermatozoa were incubated in the absence (●) or presence of 10 mM citrate (■) or 10 mM L-lactate (▲) and, at the indicated times, aliquots were taken to determine the intracellular ATP levels. B: Spermatozoa were incubated for 15 min with increasing concentrations of citrate (■) or L-lactate (▲) and aliquots were taken to determine the intracellular concentration of ATP. Results shown are means±S.E.M. for 8 separate experiments.

3.5. Effects of the Incubation with L-Lactate and Citrate in CO₂ Production

The incubation of boar spermatozoa with increasing concentrations of [¹⁴C]lactate induced a dose-dependent increase in the extracellular levels of ¹⁴CO₂, which reached maximal values (48.1±6.7 nmol/mg protein) after 60 min in the presence of 50 mM lactate (Figure 5). A similar, dose-dependent effect was observed after incubation with [¹⁴C]citrate although in this case, at 1 mM citrate, CO₂ values were lower than those obtained with lactate. At higher concentrations of citrate, CO₂ production reached similar values to those of lactate (Figure 5).

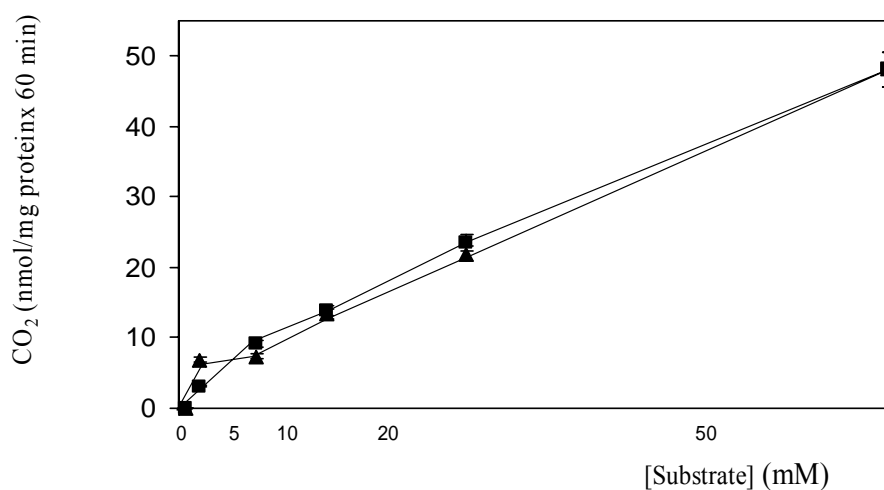


Figure 5

Figure 5. Concentration-dependent effects of citrate and L-lactate on the rhythm of CO₂ production. Spermatozoa were incubated for 60 min with increasing concentrations of citrate (■) or L-lactate (▲) and aliquots were taken to determine the extracellular formation of CO₂. Results shown are means±S.E.M. for 8 separate experiments

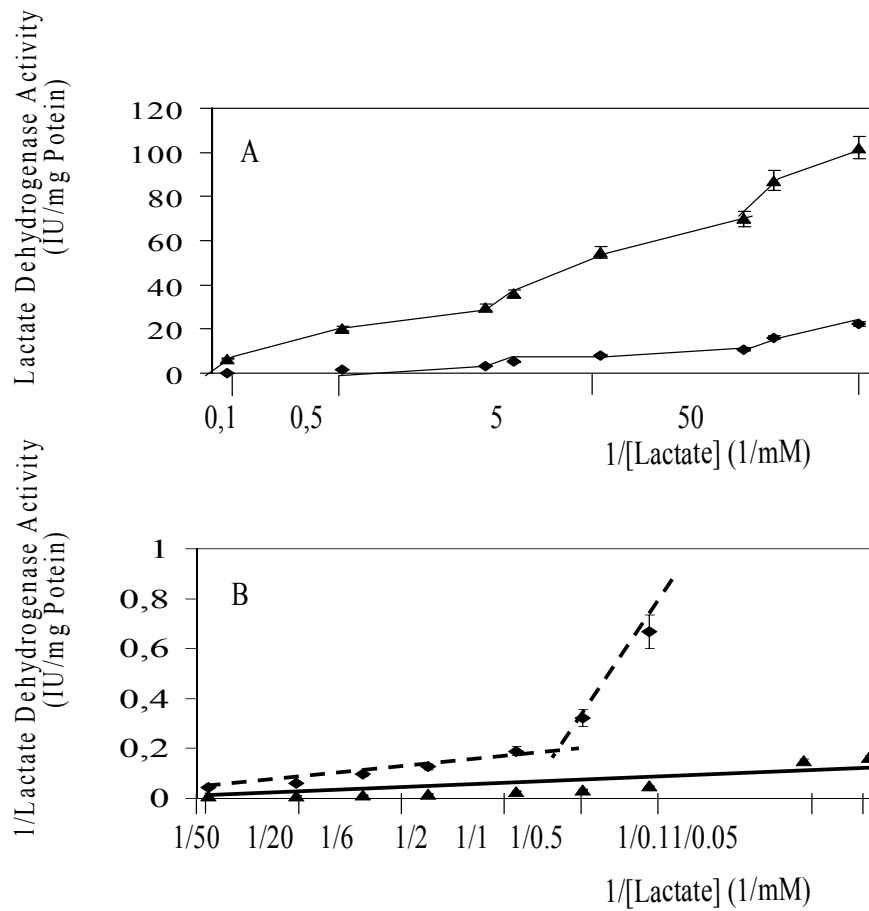


Figure 6

Figure 6. Kinetics of total lactate dehydrogenase activity in boar-sperm extracts. A: Relationship between total lactate dehydrogenase activity and L-lactate concentration in supernatants (▲) and resuspended pellets (◆) from boar-spermatozoa extracts. B: Semi-logarithmic representation between inverse values of total lactate dehydrogenase activity and L-lactate concentrations in supernatants (▲) and resuspended pellets (◆)

from boar-sperm extracts. Lines show the apparent lactate dehydrogenase activity types from supernatants (continuous line) and resuspended pellets (broken lines) revealed by this representation. Results shown are means \pm S.E.M. for 8 separate experiments.

3.6. Kinetic Behavior of Total Lactate Dehydrogenase Activity of Boar Spermatozoa

Supernatants and pellets obtained from boar-sperm homogenates showed very distinct LDH kinetics. Supernatants showed a progressive increase in LDH activity in the presence of lactate concentrations ranging from 0.1 mM to 50 mM, reaching maximal values (102.2 \pm 3.4 IU /mg protein) at 50 mM lactate (Figure 6A). On the contrary, resuspended pellets showed lower LDH activity, and, in fact, there was no detectable enzymatic activity at lactate concentrations of 0.05 mM-0.1 mM (Figure 6A). At higher concentrations of lactate, LDH activity of resuspended pellets first showed a noticeable increase between 0.5 mM and 1 mM of the substrate, and then a further, progressive increase, reaching maximal values of activity (22.3 \pm 3.4 IU /mg protein) at 50 mM lactate (Figure 6A).

The Lineweaver-Burke representation of LDH activity in both supernatants and resuspended pellets also reflected their distinct kinetic behavior (see Figure 6B). Whereas supernatants showed the presence of a single, linear LDH activity, with a theoretically calculated K_m of 0.51 mM, resuspended pellets resulted in the appearance of two separate linear LDH activities. The first, at lactate concentrations of 0.5 mM-1 mM, with a theoretical K_m of 15.0 mM, and the second, at lactate concentrations of 2 mM-50 mM, with a theoretically calculated K_m of 5.9 mM (Figure 6B). However, it is important to note that the first linear activity calculated in the resuspended pellets was obtained from only 2 concentrations of substrate (there was no detectable LDH activity below 0.5 mM lactate, as indicated above), and therefore, the theoretical K_m can be assumed only as an approximation, and possibly this kinetic line could be integrated

into the other. In this case, the new, theoretical calculated K_m for this integrated kinetics is of 6.9 mM (data not shown).

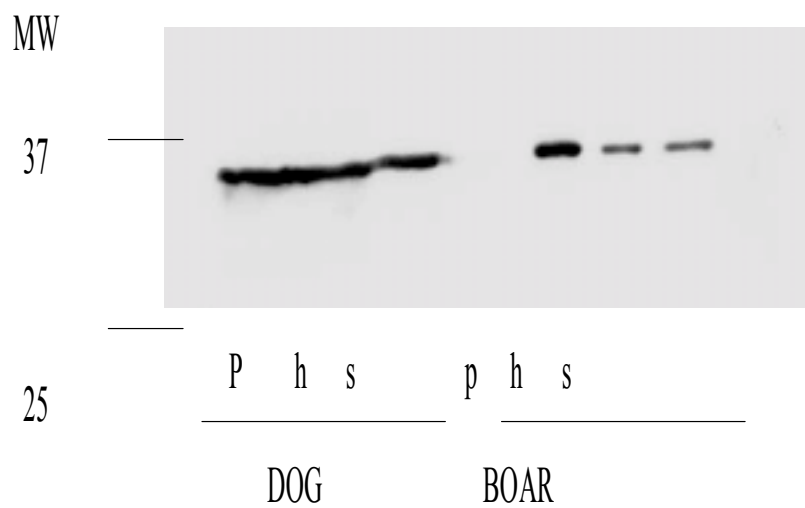


Figure 7

Figure 7. Western blot against sperm-specific LDH in boar spermatozoa extracts. The Figure shows a representative Western blot obtained from supernatants (s), resuspended pellets (p) and total extracts (h) from dog (DOG) and boar (BOAR) homogenates obtained from fresh samples. MW: Molecular weights. The total number of independent replicates for this Western blot was 5.

3.7. Determination of the Presence of an Sperm-Specific Type of LDH in Boar Sperm

The existence of a sperm-specific type of LDH has been determined by other authors in boar (Coronel et al., 1983; Jones, 1997). Therefore, the presence of this isoform in boar, and dog spermatozoa was tested using a specific antibody. Western blot analysis from both boar and dog extracts clearly showed the presence of a specific band of about 35 Kda, which matches to that published before in human (Gupta and Kang, 2000, see Figure 7). It is noteworthy the the sperm-specific LDH band was found in both supernatants and resuspended pellets (Figure 7). On the other hand, immunocytochemical analysis using the same antibody on boar sperm showed a positive reaction located in the principal piece of the tail, with a very weak signal in the midpiece (Figure 8), indicating that the sperm-specific type of LDH is mainly located in the principal piece of boar spermatozoa.

3.8. Effects of the Incubation with L-Lactate and Citrate in the Tyrosine-Phosphorylation Pattern

As shown in Figure 9A, the Tyr-Phos pattern of whole boar extracts shows a specific pattern, with a major band at about 45 Kda (Figure 9) Incubation with 10 mM citrate and 10 mM lactate induced a noticeable increase in the intensity of all bands, especially, the 45 Kda band. Notwithstanding, there were no significant changes in the specific Tyr-Phos pattern, regardless changes in the intensity of the bands (Figure 9).

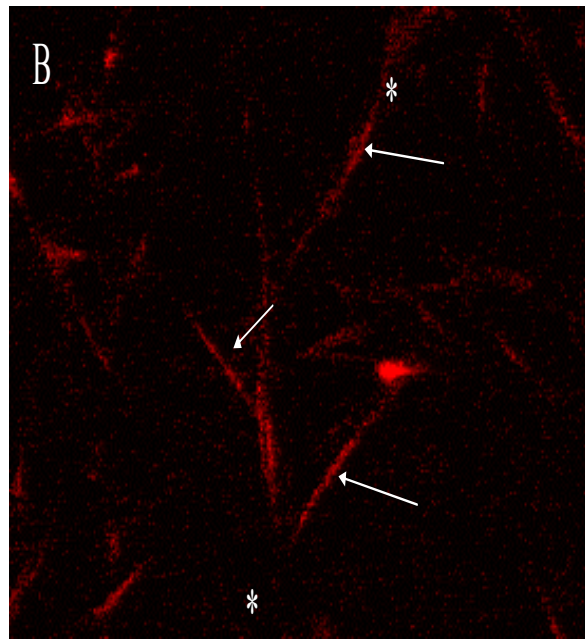
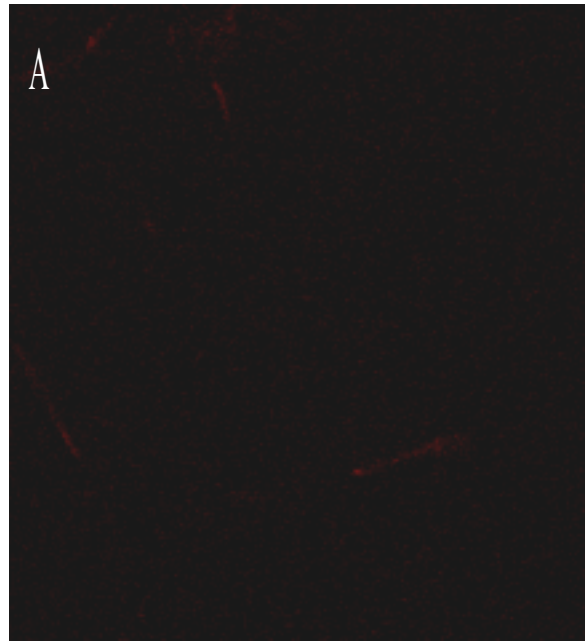


Figure 8

Figure 8. Immunocytochemistry of boar, sperm-specific lactate dehydrogenase. The Figure shows representative images of boar spermatozoa immunolocalized against sperm-specific lactate dehydrogenase. A: Negative control. B: Cells from fresh, control samples. The total number of independent replicates for this experiment was 5. Images have a multiplication factor of 75. Arrows indicate principal piece of the tails, whereas asterisks indicate sperm heads.

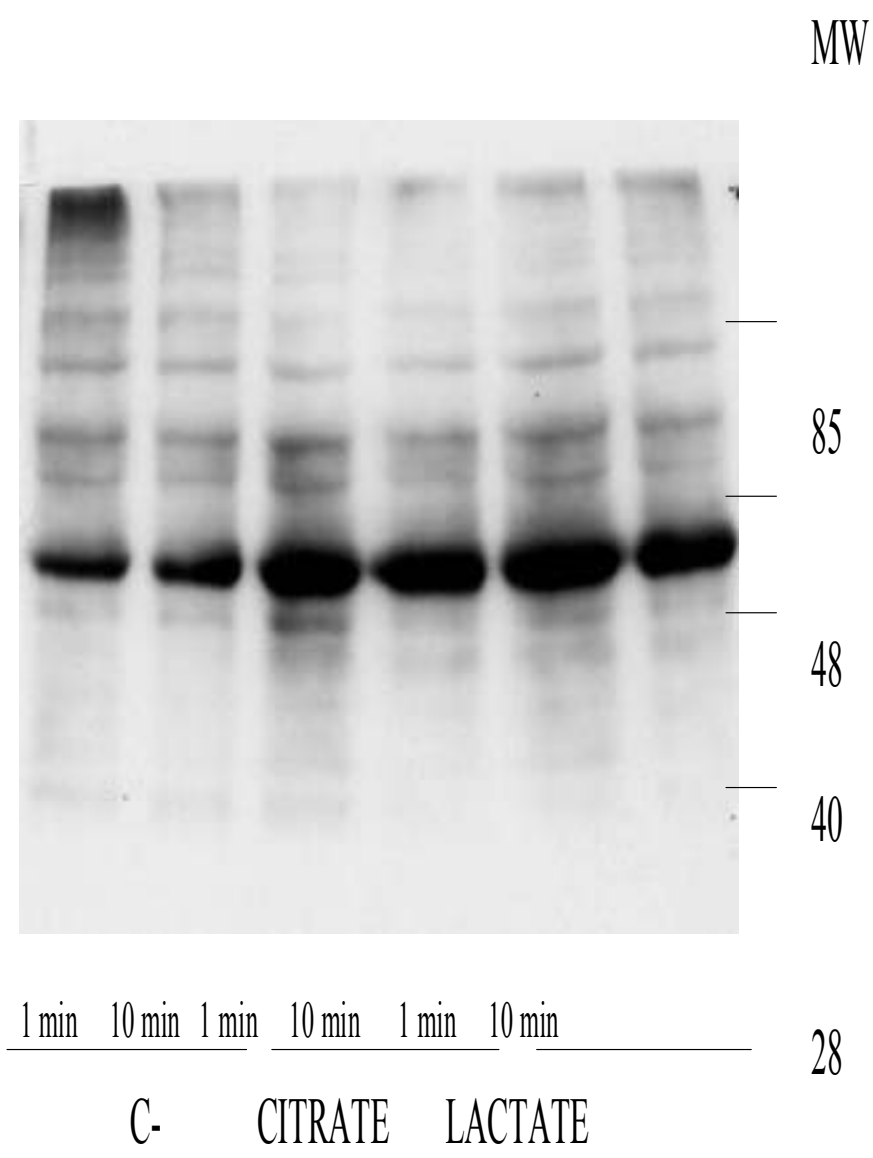


Figure 9

Figure 9. Tyrosine phosphorylation pattern of boar spermatozoa incubated with 10 mM citrate or 10 mM L-lactate. Aliquots were collected at the indicated times to determine the tyrosine phosphorylation pattern after a Western blot analysis against an anti-mouse phosphorylated tyrosine antibody. The amount of total protein analyzed in each lane was 30 μ g. The Figure shows a representative Western blot from 5 independent replicates. C-: Samples incubated without energy substrates. CITRATE: Cells incubated with 10 mM citrate. LACTATE: Sperm incubated with 10 mM L-lactate. MW: Molecular weights.

4. DISCUSSION

Our results show that boar sperm from fresh ejaculates efficiently utilize citrate and lactate as the sole energy sources in the absence of other energy substrates, as reflected by the increase in intracellular ATP levels induced by both substrates. This utilization, which has already been described (Calvin and Tubbs, 1978; Jones, 1997), takes place mainly through the Krebs cycle, as the rate of CO₂ production shows. This assertion is reinforced by the fact that the inhibition of the pyruvate carboxylase anaplerotic step prevents the extracellular formation of lactate from citrate, thus indicating that citrate is metabolized through the Krebs cycle, and that one of its final products is lactate, as well as CO₂. Furthermore, our results also indicate that metabolization of both lactate and citrate maintains ATP intracellular levels within limits that are equal to those found in freshly obtained spermatozoa. This suggests that both lactate and citrate could be utilized by boar spermatozoa to maintain their basic functions in the absence of other exogenous substrates that would be a greater energy potential, such as glucose or fructose (Jones and Connor, 2000; Marín et al., 2003). Thus, the metabolic strategy of boar spermatozoa is designed to maximize efficiency based on the possible exogenous and endogenous substrates found in the male and female genital tract.

In a previous report, Jones indicated that lactate enters the Krebs cycle through a direct pathway which does not need its conversion to pyruvate (Jones, 1997). Moreover, this direct pathway not only produces energy but also reductive potential, allowing to regenerate NAD⁺ (Jones, 1997). Our results are in agreement with this observation, as shown not only by the results of energy parameters but also by those involving general-function characteristics, such as percent sperm viability, acrosomal status and sperm motility. In addition, the results observed on citrate metabolization could be interpreted in the same way. Thus, citrate utilization could be accomplished through two pathways:

(i) by a direct metabolization through the Krebs cycle, which will yield CO₂ and ATP; and (ii) by an indirect pathway, which will follow two steps: the first one involving the entry of citrate into the Krebs cycle, and the second involving the passing of the Krebs cycle, citrate-derived metabolites through the pyruvate carboxylase step and the further formation of lactate, which, in turn, will be sent to the extracellular medium and again re-entering into the Krebs cycle through the LDH step. At first glance, the exact meaning for this complicated utilization of citrate can not be immediately understood. However, if we consider that the maintenance of the precise NAD⁺/NADH intracellular equilibrium is of paramount importance to stabilize sperm function (Baker and Aitken, 2004), the lactate-derived citrate can be basic in order to re-establish this equilibrium, and, in this manner, citrate can be utilized not only as an energy source but also as a feasible system to stabilize the redox equilibrium of boar spermatozoa in these conditions.

The above described complex mechanisms of lactate and citrate metabolism highlight the importance that the control of LDH activity has in boar spermatozoa. Since LDH catalyzes the entry of lactate into the Krebs cycle, a complex regulation would be needed to finely modulate both lactate and citrate metabolism. In this regard, it is noteworthy that mammalian sperm has a specific LDH isoform, which has been described in several species (Coronel et al., 1983; Pan et al., 1983; Pawloswski and Brinkmann, 1992; Jones, 1997). In the specific case of boar sperm, it has been shown that the sperm-specific LDH isoform is the most important form found, and therefore it has been postulated that this isoform is the most important one to regulate lactate metabolism in these cells (Jones, 1997). The results of the immunocytochemical analysis are in agreement with this postulate, since we also found a sperm-specific LDH isotype in boar sperm, which is located mainly at the principal piece of the tail. Nevertheless,

the kinetics study indicates that boar-sperm LDH activity presents a more complex behavior than that expected for a single isoform. Thus, we found a major LDH activity with a high affinity for lactate (the estimated K_m was of 0.51 mM). This activity could correspond to that associated with the sperm-specific LDH isoform, since this is practically the only one found by immunocytochemical techniques in boar sperm (Jones, 1997). Our results also indicate that the activity associated with this enzyme was the greatest in these cells. It is also noteworthy that the major LDH kinetic was present in the sperm soluble fraction, thus indicating that the protein responsible for this activity was either free or loosely linked to the non-soluble sperm structures, such as the axoneme, mitochondria or nucleus. We also found, at least, another minor enzyme kinetic, with a lower affinity for lactate (the estimated K_m was either of 5.9 mM or 6.9 mM) and closely associated with some unidentified non-soluble sperm structures, since this enzyme kinetic was only developed in the resuspended pellets from boar-sperm extracts. On the other hand, the presence of more than one kinetic activity does not necessarily preclude the presence of more than one protein which catalyzes this activity. In fact, the detection of a specific reaction against the anti-sperm-specific LDH antibody in the resuspended pellets supports the hypothesis that boar sperm has a single LDH isoform which changes its kinetic activity depending on its association with some sperm structures. In this way, the LDH protein which either free or loosely associated with the axoneme, nucleus or mitochondrial sheath would present a kinetic behavior different from the same protein closely associated to some of these structures. Changes in the activity of a protein depending on changes in its cellular location have been described in systems such as dog sperm, where the glycogen synthase modifies its activity, at least partially, by spatial changes after activation through incubation with both glucose and

fructose (Palomo et al., 2003). Thus, a similar mechanism could explain the results observed in boar-sperm LDH.

In any case, having one single or two separate LDH proteins the functional result is the presence of at least two separate kinetic LDH activities in boar spermatozoa. In fact, the presence of more than one kinetic activity for a single enzyme is not uncommon in eucaryotic cells. Focusing on sperm energy metabolism, we found this phenomenon with hexokinase in dog (Fernández-Novell et al., 2004) and with hexose transporters such as GLUT 3, GLUT 5 and SGLT-family related proteins in several mammalian species (Angulo et al., 1998; Rigau et al., 2002). The case of hexokinase in dog sperm can serve to understand boar LDH, since we also found two different hexokinase kinetics, one with a very high affinity for glucose, and another one with a much lower affinity, which were also located in separate fractions of cell extracts (Fernández-Novell et al., 2004). The existence of two activities with very different K_m for the same substrate can be explained from a regulatory point of view. Thus, this system is employed by the liver and pancreas to control and detect extracellular glucose content variations in order to adapt their energy and insulin metabolism to these changes (Cárdenas et al., 1998), and a similar role has been proposed for the separate hexokinases in dog sperm (Fernández-Novell et al., 2004). According to this, the presence of a high- K_m LDH activity can act as a sensitive sensor of changes in lactate levels, which, in turn, will optimize the use of this substrate depending on both the concentration and the original source of this energy substrate.

Our results indicate that both citrate and lactate induce activation of boar-sperm function. This can be inferred by the observed increase in the intensity of tyrosine phosphorylation that followed the incubation with both substrates. It is noteworthy that this increase is generic, without any citrate- or lactate-specific increase of a specific

band. This implies that the overall increase in tyrosine phosphorylation is the result of a lactate- and citrate-induced increase in energy supplies more than a specific effect of substrates in the activation of a specific tyrosine kinase. This result is different from that observed with other species and substrates, such as dog sperm incubated with glucose or fructose (Rigau et al., 2002). However, the lack of a specific, lactate- or citrate-induced effect on tyrosine phosphorylation is not very surprising, and the observed overall increase can be related to the concomitant increase in intracellular ATP levels observed after incubation with the effector. Thus, our results show that both citrate and lactate cause an activation of overall sperm function in boar sperm by a mechanism related to the concomitant increase on ATP levels induced by the utilization of both substrates.

In conclusion, the results of the present study indicate boar sperm efficiently metabolize citrate and lactate through a metabolic pathway regulated by LDH in order to obtain sufficient energy to maintain and even increase overall boar sperm function. This LDH activity shows two distinct activities with different affinities for lactate.

5. REFERENCES

- Angulo C, Rauch MC, Droppelmann A, Reyes AM, Slebe JC, Delgado-López F, Guaiquil VH, Vera JC, Concha II. Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa: cellular localization and transport of hexoses and vitamin C. *J Cell Biochem.* 1998;71:189-203.
- Bahl JJ, Matsuda M, DeFronzo RA, Bressler R. In vitro and in vivo suppression of gluconeogenesis by inhibition of pyruvate carboxylase. *Biochem Pharmacol.* 1997;53:64-67.
- Baker MA, Aitken RJ. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;216:47-54.

- Ballester J, Fernández-Novell JM, Rutllant J, García-Rocha M, Palomo MJ, Mogas T, Peña A, Rigau T, Guinovart JJ, Rodríguez-Gil JE. Evidence for a functional glycogen metabolism in mature mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Develop.* 2000;56:207-219.
- Bamba, K. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology.*1988;29:1245-1251.
- Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
- Burnett WN. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated proteins. *J Anal Biochem.* 1981;112:195-203.
- Calvin J, Tubbs PK. Mitochondrial transport processes and oxidation of NADH by hypotonically –treated boar spermatozoa. *Eur J Biochem.* 1978;89:315-320.
- Cárdenas ML, Cornish-Bowden A, Ureta T. Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1401:242-264.
- Coronel CE, Burgos C, Pérez de Burgos NM, Rovai LE, Blanco A. Catalytic properties of the sperm-specific lactate dehydrogenase (LDH X or C4) from different species. *J Exp Zool.* 1983;225:379-385.
- Fernández-Novell JM, Ballester J, Medrano A, Otaegui PJ, Rigau T, Guinovart JJ, Rodríguez-Gil JE. The presence of a high-Km hexokinase activity in dog, but not in boar, sperm. *FEBS Lett.* 2004;570:211-216.
- Gupta SS and Kang BP. Molecular and kinetic properties of sperm specific LDH after radiation inactivation. *Mol Cell Biochem.* 2000;206:27-32.

- Jones AR, Chantrill LA, Cokinakis A. Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1992;94:129-134.
- Jones AR. Metabolism of lactate by mature boar spermatozoa. *Reprod Fertil Develop*. 1997;9:227-232.
- Jones AR, Connor DE. Fructose metabolism by mature boar spermatozoa. *Reprod Fertil Develop*. 2000;12:355-359.
- Lambrecht M, Transtschold D. ATP determination with hexokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase. In: Bergmeyer UH, ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie; 1984: 543-551.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-685.
- Marín S, Chiang K, Bassilian S, Lee W-N P, Boros LG, Fernández-Novell JM, Centelles JJ, Medrano A, Rodríguez-Gil JE, Cascante M. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Lett*. 2003;554:342-346.
- Michal G. Glucose 6-phosphate. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie; 1984: 191-197.
- Noll, F. L-lactate. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie; 1984: 582-588.
- Palomo MJ, Fernández-Novell JM, Peña A, Guinovart JJ, Rigau T and Rodríguez-Gil JE. Glucose- and fructose-induced dog-sperm glycogen synthesis shows specific changes in the location of the sperm glycogen deposition. *Mol Reprod Develop*. 2003;64:349-359.

- Pan YC, Sharief FS, Okabe M, Huang S, Li SS. Amino acid sequence studies on lactate dehydrogenase C4 isozymes from mouse and rat testes. *J Biol Chem.* 1983;258:7005-7016.
- Pawlowski R, Brinkmann B. Evaluation of sperm specific lactate dehydrogenase isoenzyme C4 (LDH C4): application to semen detection in stains. *Int J Legal Med.* 1992;105:123-126.
- Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology.* 2004;61:673-690.
- Rigau T, Rivera M, Palomo MJ, Fernández-Novell JM, Mogas T, Ballester J, Peña A, Otaegui PJ, Guinovart JJ, Rodríguez-Gil JE. Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. *Reproduction.* 2002;123:579-591.
- Wahlefeld AW (1984) LDH activity: UV-method with L-lactate and NAD. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of Enzymatic Analysis.* Weinheim: Verlag Chemie; 1984: 126-133.

CAPÍTULO IV
TEXTO EN ESPAÑOL

**UTILIZACIÓN DE CITRATO Y DE LACTATO A TRAVÉS DE UNA VÍA REGULADA
POR LA ACTIVIDAD LACTATO DESHIDROGENASA Y LOS NIVELES DE ATP EN
ESPERMATOZOIDES DE CERDO.**

Antonio Medrano ¹, Josep M^a Fernández-Novell ², Laura Ramió ¹, Juan Álvarez ³,
Erwin Goldberg ⁴, M^a. Montserrat Rivera ¹, Joan J. Guinovart ², Teresa Rigau ¹ y Joan
E. Rodríguez-Gil^{1*}.

1 Unidad de Reproducción Animal. Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. E-08193 Bellaterra. España.

2 Departamento de Bioquímica y Biología Molecular e IRBB. Parc Científic de Barcelona. Universidad de Barcelona. E-08028 Barcelona. España.

3 Centro de Infertilidad Masculina ANDROGEN, La Coruña. España.; escuela de Medicina Harvard, Boston.

4 Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad del Noreste,
2205 Parque Tecnología, Evanston, IL,

Financiado por el proyecto AGL2001-2568 del Ministerio de Ciencia y Tecnología de España

* La correspondencia debe dirigirse a Joan E. Rodríguez-Gil. Unidad de Reproducción Animal. Depto. de Medicina y Cirugía Animal. Escuela de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. E-08193 Bellaterra. España.

Teléfono: 34-935811045

Fax: 34-935812006

E-mail: juanenrique.rodriguez@uab.es

To be submitted

RESUMEN

La incubación de espermatozoides de cerdo en un medio de Krebs-Ringer-Henseleit básico adicionado con lactato o citrato a concentraciones de 10 mM provocó en ambos casos un rápido aumento en los niveles intracelulares de ATP que alcanzó un pico tras sólo 30 segundos de incubación. La utilización de citrato y lactato inducía también la salida de CO₂ al medio extracelular indicando que ambos sustratos fueron metabolizados a través del ciclo de Krebs. La incubación con citrato generó lactato extracelular. La formación de lactato a partir de citrato se inhibía si se añadía al medio ácido fenilacético. Esta inhibición indica que el lactato se produce por una vía relacionada con la actividad piruvato carboxilasa. Por otra parte, también se pudo observar un incremento significativo en la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina tras la incubación tanto con lactato como con citrato. Los espermatozoides de cerdo presentan una isoforma específica del enzima lactato deshidrogenasa (LDH), que se localiza principalmente en la pieza principal de la cola. Los estudios de cinética enzimática mostraron que los espermatozoides porcinos tienen, pro lo menos, dos actividades diferentes relacionadas con la LDH. La actividad más intensa (con una Km. estimada de 0,51mM) se localiza en el sobrenadante de los extractos espermáticos, mientras que la menos activa (con una Km. estimada de 5.9mM) aparece en la fracción no soluble de los extractos espermáticos. Todos estos resultados indican que los espermatozoides de cerdo metabolizan eficazmente el citrato y el lactato a través de una vía metabólica regulada por la LDH y dependiente de los niveles intracelulares de ATP.

1. INTRODUCCIÓN.

Los espermatozoides de mamífero necesitan un gran aporte energético tras la eyaculación. De hecho, diferentes sustratos pueden ser utilizados por los espermatozoides para satisfacer sus requerimientos energéticos. Diversos autores han

descrito que el espermatozoide de cerdo obtiene energía no solo de la glucosa y la fructosa (Jones, 1997; Jones y Connor, 2000; Marín et al., 2003), sino también de compuestos diferentes a las hexosas, tales como lactato (Jones, 1997), piruvato (Jones, 1997) y glicerol (Jones et al., 1992). La capacidad del espermatozoide de cerdo para utilizar estos sustratos diferentes a las hexosas podría permitirle aumentar sus posibilidades de supervivencia en condiciones en las que el suministro de monosacáridos se encuentra limitado. Por lo tanto, la estrategia metabólica de utilización de muy diferentes sustratos energéticos podría jugar un papel importante en la capacidad fertilizante del espermatozoide de cerdo.

Sin embargo, los mecanismos de utilización de sustratos diferentes a los monosacáridos por parte de los espermatozoides de cerdo no son bien conocidos. En este sentido, cabe destacar la elevada tasa glucolítica que presenta el espermatozoide de cerdo (Marín et al., 2003). Este hecho es de importancia si consideramos que algunos metabolitos, como el glicerol, pueden utilizarse a través de su incorporación a la vía glucolítica, mientras que otros, como el lactato, el piruvato y el citrato, son utilizados a través de una vía diferente de la glucólisis, como el ciclo de Krebs. No obstante, los estudios metabolómicos han revelado que el espermatozoide de cerdo recién eyaculado, incubado en presencia de glucosa tiene un flujo muy bajo a través del ciclo de Krebs (Marín et al., 2003). Este hecho abre la interrogante acerca de cómo los espermatozoides de cerdo recién eyaculados utilizan sustratos no monosacáridos y no metabolizables a través de la glucólisis como fuentes de energía, bien sea por una activación previa del ciclo de Krebs en ausencia de azúcares o bien por la utilización de otra vía metabólica diferente de la glucólisis o el ciclo de Krebs. Esta es una cuestión importante, ya que su resolución permitiría entender otros aspectos tales como, las

estrategias utilizadas por el espermatozoide porcino para mantener de forma óptima su funcionalidad dentro del tracto genital de la hembra.

El objetivo principal de este estudio ha sido determinar la eficacia en la utilización de dos sustratos no monosacáridos, citrato y lactato por parte de los espermatozoides de cerdo obtenidos de eyaculados frescos. Para ello, los espermatozoides de cerdo se incubaron en medios que contenían concentraciones crecientes de ambos sustratos y su utilización metabólica fue analizada mediante el uso de parámetros clásicos del metabolismo energético, como el ritmo de formación de lactato y CO_2 extracelulares y los niveles intracelulares de glucosa 6-fosfato (G6-P), glucógeno y ATP. Además, también se determinó la cinética enzimática de la actividad lactato deshidrogenasa total (LDH), así como la localización intracelular de la LDH específica de espermatozoide, puesto que esta actividad controla la entrada de sustratos al ciclo de Krebs y a partir de aquí a otras vías metabólicas alternativas. Nuestros resultados muestran que tanto el citrato como el lactato son utilizados por los espermatozoides de cerdo siendo metabolizados a través del ciclo de Krebs, si bien el citrato también es utilizado por otra vía que produce lactato como subproducto metabólico. La utilización energética de ambos sustratos induce la formación de niveles elevados de ATP intracelular, los cuales son suficientes para mantener la motilidad y activar la fosforilización en residuos de tirosina (Tyr-phos). En conclusión, uno de los puntos clave en el control de la utilización del citrato y el lactato parece ser la actividad LDH, la cual presenta un comportamiento complejo, con la presencia de diferentes actividades de características muy diferentes y además muy sensibles a bajas concentraciones de lactato.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Recogida de semen y procesado de las muestras.

El trabajo se llevó a cabo a partir de dosis seminales de 15 cerdos sanos y sexualmente maduros pertenecientes a una granja comercial (Servicios Genéticos Porcinos, S.L.; Roda de Ter, España). Los cerdos eran de las siguientes razas: 6 Blancos Belgas, 5 Large White x Pietrain, 2 Pietrain y 2 Landrace, teniendo todos ellos entre 2 y 3 años de edad. La fracción del eyaculado rica en espermatozoides se recogía manualmente e inmediatamente se depositaba en un baño termostatzado a 37 °C. Seguidamente, el semen se diluía hasta una concentración final de 2×10^7 espermatozoides/mL calculada mediante una cámara hemocitométrica en un diluyente comercial para semen refrigerado (diluyente MR-A. Kubus, S.A.; Majadahonda, España) y se dividía en dosis comerciales de 100mL destinadas a la IA. Cuatro de estas dosis fueron colocadas en un refrigerador portátil a 16° C durante 90 minutos, que era el tiempo requerido para llegar al laboratorio. Una vez allá, las muestras se centrifugaron a 600g durante 10 minutos a 16° C en una centrífuga de temperatura controlada y fueron resuspendidas en 50 mL de medio de Krebs-Ringer-Henseleit libre de azúcares a 16 °C (medio KRH-; pH 7,4). Los espermatozoides fueron centrifugados nuevamente a 600g durante 10 minutos a 16 °C y el sedimento celular fue resuspendido otra vez en 50 mL de medio KRH-. El proceso de centrifugación y resuspensión se repitió una vez más para eliminar cualquier resto del plasma seminal y/o del diluyente comercial. Finalmente, los 50 mL de suspensión de espermatozoides se centrifugaron de nuevo a 600g durante 10 minutos a 16 °C y las células espermáticas fueron finalmente resuspendidas en 2 mL de medio KRH-. En este momento, las células de las cuatro dosis de IA fueron agrupadas y distribuidas equitativamente en tubos abiertos, que se colocaron a 37 °C. En estos tubos se llevaron a cabo las incubaciones con células en medio KRH- al cual se le añadía citrato o lactato

en las concentraciones estudiadas. Después se tomaron alícuotas del semen incubado a los tiempos indicados en el estudio, dependiendo del análisis requerido. Una vez tomadas, las alícuotas fueron procesadas de manera específica, según el parámetro a analizar. Las diferentes técnicas de procesamiento llevadas a cabo fueron las siguientes: Para determinar los porcentajes de viabilidad y acrosomas alterados, se tomaron alícuotas de 30 μL que inmediatamente se tiñeron mediante la técnica de Eosina-Nigrosina (Bamba, 1988; modificado por Quintero-Moreno, 2004). Los porcentajes de viabilidad y acrosomas alterados fueron establecidos después de contar 200-300 espermatozoides en cada muestra.

Para determinar los niveles extracelulares de lactato y glucosa, así como el contenido intracelular de G 6-P, glucógeno y ATP, alícuotas de 250 μL de la suspensión de espermatozoides fueron centrifugados inmediatamente a 1000g durante 1 minuto. El sobrenadante y el sedimento celular obtenidos fueron separados y congelados inmediatamente en N_2 líquido. El sobrenadante fue utilizado para determinar los niveles extracelulares de lactato y de glucosa, mientras que los sedimentos se trataron para determinar el contenido de G 6-P, glucógeno o ATP. Las muestras fueron almacenadas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta el momento de su análisis. En todos los casos se tomaron alícuotas de 10 μL antes del análisis, para la determinación de la proteína total de la muestra.

Para la determinación de G 6-P y contenido de ATP, los sedimentos celulares congelados fueron homogenizados por sonicación con 300 μL de HClO_4 al 10% (v/v) a 4°C . Los homogenizados obtenidos se centrifugaron a 10000g durante 15 minutos a 4°C , y el sobrenadante resultante fue neutralizado con K_2CO_3 , 5M antes del análisis.

Para la determinación del contenido de glucógeno, el sedimento celular congelado fue homogenizado por sonicación con KOH al 30 % (p/v) y luego calentado a 100 °C durante 15 minutos. Los extractos así procesados fueron utilizados para el análisis.

Dosis individuales comerciales para AI de 100 mL enteras fueron centrifugadas a 600g durante 10 minutos a 16 °C para determinar la actividad LDH total. El sedimento espermático fue resuspendido con 50 mL de medio KRH-, y el proceso de centrifugación/resuspensión se repitió dos veces más para completar la total eliminación de todas las sustancias incluidas en el medio que pudieran afectar las propiedades cinéticas de la LDH espermática. Finalmente, la suspensión de espermatozoides se centrifugó de nuevo a 600g durante 10 minutos a 16°C. Tras ello, el sobrenadante se desechó, y el sedimento celular resultante fue homogenizado por sonicación con 500µL de un tampón 10mM Tris/HCl a 4°C (pH 7,4) conteniendo 150 mM de KCl, 0,6 M de sacarosa, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 1 mM de benzamidina, 25 µg/mL de leupeptina y 50 mM de β-mercapto etanol (tampón de homogenización). Tras la homogenización, las muestras se centrifugaron a 10000g durante 15 minutos a 4°C. La actividad LDH fue determinada tanto en el sobrenadante como en el sedimento resultante. Para la determinación en el sedimento, éste fue lavado una vez con 500µL de tampón de homogenización para eliminar cualquier resto de actividad LDH asociada con el sobrenadante. Los sedimentos así lavados se resuspendían en 250µL de tampón de homogenización, determinándose aquí la actividad LDH. De nuevo, fueron tomadas alícuotas de 10µL tanto del sobrenadante como del sedimento resuspendido para determinar el contenido total de proteína de las muestras.

Para determinar el ritmo de producción de CO₂, se procesaron 4 de dosis de IA y se combinaron tal y como se ha descrito anteriormente. Alícuotas de 500µL de la suspensión resultante de espermatozoides en medio KRH- fueron incubadas durante 60

minutos a 37°C en tubos cerrados en presencia de concentraciones crecientes de [U¹⁴C] lactato o [1-5¹⁴C] citrato. La cantidad de radioactividad agregada en cada envase fue de aproximadamente de 640000 cpm en el caso de [U¹⁴C] lactato y de aproximadamente 430000 cpm en el caso del [1-5¹⁴C] citrato. Al final de las incubaciones, un trozo de papel de filtro empapado con 200 µL de feniletilamina se colocó en cada uno de los envases, evitando cuidadosamente el contacto directo con la suspensión. Antes de agregar el material radiactivo, una alícuota de 10 µL de suspensión celular fue tomada para determinar la cantidad total de proteína.

2.2. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS.

Los niveles intracelulares de G 6-P se determinaron mediante la técnica enzimática descrita por Michal (1984), y siguiendo las modificaciones hechas descritas en Rigau et al. (2002), para aumentar la precisión del análisis.

Las concentraciones de L-lactato (Noll, 1984), glucógeno (Ballester et al., 2000), ATP (Lambrecht y Transchold, 1984) y la actividad lactato deshidrogenasa (Wahlfeld, 1984) fueron determinadas mediante las técnicas enzimáticas citadas. Los niveles de glucosa extracelular fueron determinados enzimáticamente usando un kit comercial (GlucoQuant; Boehringer Mannheim; Mannheim, Alemania). Todas estas técnicas, así como la de determinación de G 6-P, se adaptaron a un autoanalizador centrífugo Cobas-Bio (Roche biomedical; Basel, Suiza).

El contenido total de proteína de las muestras se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), usado un reactivo comercial (laboratorios Bio-Rad, Hércules, CA).

2.3. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS.

Se realizaron análisis de Western blot en espermatozoides de cerdo que habían sido homogenizados mediante sonicación con tampón Tris-HCl a 4°C (pH 7,4). Este tampón

contenía además 1% (p/v) de dodecil sulfato de sodio (SDS) y Na_2VO_4 1M (en proporción 1:5, v/v) para evitar cambios en el estado general de fosforilización global del homogenizado (Tampón Western). Las muestras fueron brevemente hervidas y se centrifugaron luego a 10000g durante 15 minutos a 4°C. El análisis del Western blot se realizó en el sobrenadante resultante y en el sedimento, el cual fue lavado una vez con 500 μL de tampón Western para eliminar cualquier reacción positiva remanente asociada con restos de sobrenadante. Finalmente, el sedimento lavado fue resuspendido en 250 μL de tampón Western, y el resuspendido resultante fue a su vez utilizado para el análisis. Finalmente, el homogenizado espermático total también se utilizó sin la separación entre el sobrenadante y el sedimento por centrifugación. El análisis inmunológico de tanto los homogenizados totales, los sobrenadantes y los sedimentos resuspendidos se llevó a cabo mediante una electroforesis en gel de acrilamida (Laemmli, 1970), seguido por transferencia a una matriz de nitrocelulosa (Burnett, 1981). Las muestras transferidas fueron incubadas con los anticuerpos a una dilución de 1:1000 (v/v). La presencia de proteínas inmunoreactivas se detectó mediante el uso de anticuerpos secundarios específicos anti-suero de conejo conjugados con peroxidasa (Amersham; Little Chalfont, Reino Unido), revelándose la reacción mediante un sistema de detección ECL-Plus (Amersham).

La inmunocitoquímica frente a la LDH específica de espermatozoide se realizó sobre células esparcidas sobre portaobjetos de vidrio cubiertos de gelatina (10mmx10mm). Los espermatozoides fueron lavados con tampón fosfato salino (PBS; pH 7,4) y se fijaron con 4% (p/v) de paraformaldehído en PBS. Las muestras fijadas se incubaron primero con 1 mg/mL de NaBH_4 en PBS para eliminar la autofluorescencia, llevándose a cabo luego un bloqueo en 3% (p/v) de albúmina sérica bovina en PBS. Los espermatozoides fueron incubados entonces con el anticuerpo anti-LDH espermática a

una dilución 1:500(v/v) durante 5 horas a temperatura entre 15°C-17°C. Tras la incubación, las muestras se lavaron con PBS y seguidamente se post-incubaron con un anticuerpo secundario de inmunoglobulinas de cerdo anti-conejo conjugado con isotiocianato de tetraetilrhodamina (TRITC; Dako; Glostrup, Dinamarca) Las imágenes fluorescentes fueron obtenidas utilizando un microscopio confocal de rastreo láser Leica TCS4D (Leica Lasertechnik; Heindelberg, Alemania), adaptado a un microscopio Leitz DMIRBE invertido y con una lente de 63x (NA 1.4 aceite) Leitz Plan-Apo (Leitz; Stuttgart, Alemania). La fuente de luz fue un láser de argón/criptón.

Los espermatozoides de perro utilizados como controles en algunos Western blot fueron obtenidos de perros de raza Beagle pura sanos y sexualmente maduros del “Servei d’Estabulari” de la Universidad Autònoma de Barcelona. Estas muestras fueron procesadas en la misma forma descrita anteriormente para los espermatozoides de cerdo.

2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

En los casos oportunos, las posibles diferencias significativas entre resultados se analizaron mediante dos vías alternativas: o bien mediante un análisis ANOVA (caso de datos no pareados), o bien mediante el test de la t de Student (caso de datos pareados).

2.5. MATERIALES.

El anticuerpo contra la LDH específica de espermatozoide humano fue fabricado en el laboratorio de Dr. Erwin Goldberg (NorthWestern University; USA). El anticuerpo contra los residuos fosfotirosina provenía de ratón (PY20; Transduction Laboratories; Lexington, KY). El lactato [$U^{14}C$] y el citrato [$1-5^{14}C$] se compraron a la firma Amersham. El citrato y el L-lactato eran de Merck (Darmstadt, Alemania). El resto de los reactivos eran de calidad P.A. y fueron proporcionados por Sigma (St. Louis, MO), Merck, BioRad (Hercules, CA) y EMS (Fort Washington, PA).

3. RESULTADOS

3.1. Efecto de la incubación con citrato y lactato sobre el porcentaje de viabilidad espermática y el estado de los acrosomas.

La incubación de espermatozoides de cerdo en un medio desprovisto de sustratos energéticos provocó una progresiva disminución de la viabilidad espermática, que pasó de un 78% al inicio de la incubación hasta un 68% a los 60 minutos de incubación (Figura 1A). La adición de citrato 10mM o citrato 10mM al medio no modificó este patrón (Figura 1A). Además, la viabilidad no cambió tras 30 minutos de incubación con concentraciones crecientes de citrato o lactato (Figura 1B).

Por otra parte, se apreció un aumento en el porcentaje de espermatozoides con alteraciones acrosomales tras incubarlos en un medio desprovisto de fuentes de energía. Las alteraciones acrosomales se incrementaron desde un 14% al inicio de la incubación hasta un 22% tras 60 minutos (Figura 1C). La adición de 10 mM de citrato o 10 mM de lactato no modificó de manera significativa este incremento (Figura 1C). La incubación de espermatozoides de cerdo durante 30 minutos en presencia de concentraciones crecientes de citrato y lactato tampoco indujo ningún efecto significativo sobre el estado acrosomal (Figura 1D).

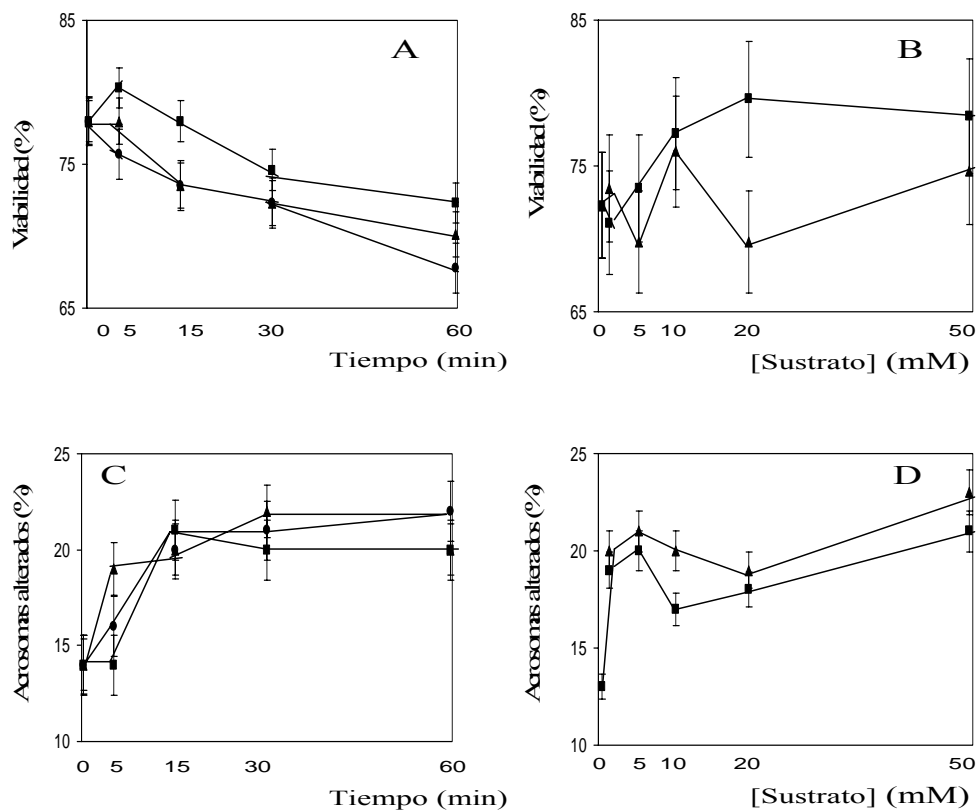


Figura 1

Figura 1. Efecto dependiente del tiempo y la concentración del citrato y el L-lactato sobre los porcentajes de viabilidad y acrosomas alterados en espermatozoides frescos de Cerdo. A,C: Los espermatozoides fueron incubados en ausencia (●) o en presencia de 10 mM de citrato (■) o de 10 mM L-lactato (▲) y, a los tiempos indicados, se tomaron alícuotas para determinar los porcentajes de viabilidad (A) y acrosomas alterados (C). B,D: Los espermatozoides fueron incubados por 30 minutos con concentraciones crecientes de citrato (■) o de L-lactato (▲) y alícuotas se tomaron para determinar los porcentajes de viabilidad (B) y acrosomas alterados (D). Los resultados muestran las medias \pm S.E.M. de 8 diferentes experimentos.

3.2. Efecto de la incubación con citrato en los niveles de L-lactato extracelular.

La incubación de espermatozoides de cerdo en un medio desprovisto de sustratos energéticos produjo un incremento muy pequeño de los niveles extracelulares de L-lactato, que fue desde $0,21 \pm 0,01 \mu\text{mol/mg}$ de proteína al inicio de la incubación hasta $0,30 \pm 0,01 \mu\text{mol/mg}$ de proteína tras 60 minutos de incubación (Figura 2). La adición de 10mM de citrato indujo un incremento significativo en los niveles extracelulares de lactato, que alcanzó valores de $2,64 \pm 0,07 \mu\text{mol/mg}$ de proteína a los 30 minutos de incubación y $3,16 \pm 0,03 \mu\text{mol/mg}$ de proteína tras 60 minutos de incubación (Figura 2A). Este efecto fue dependiente de la concentración de citrato utilizada, observándose que el efecto máximo aparecía a una concentración de 10mM. Hay que destacar el hecho que concentraciones de citrato de 20mM ($2,18 \pm 0,04 \mu\text{mol/mg}$ de proteína) y 50mM ($1,17 \pm 0,02 \mu\text{mol/mg}$ de proteína) indujeron niveles de L-lactato tras 60 minutos de incubación que fueron claramente más bajos que los obtenidos con 10 mM de citrato (Figura 2B), Esto indica un posible efecto tóxico del citrato a concentraciones por encima de 10 mM en espermatozoides de cerdo. Por otro lado, la adición de 10 mM de ácido fenilacético (PAA), un inhibidor específico de la actividad anapletórica piruvato carboxilasa (Bahl et al, 1997), al medio con citrato contrarrestó de forma prácticamente total el aumento en los extracelulares de L-lactato inducido por el citrato sin un cambio significativo en los porcentajes de viabilidad y de acrosomas alterados (Figura 2A y datos no mostrados).

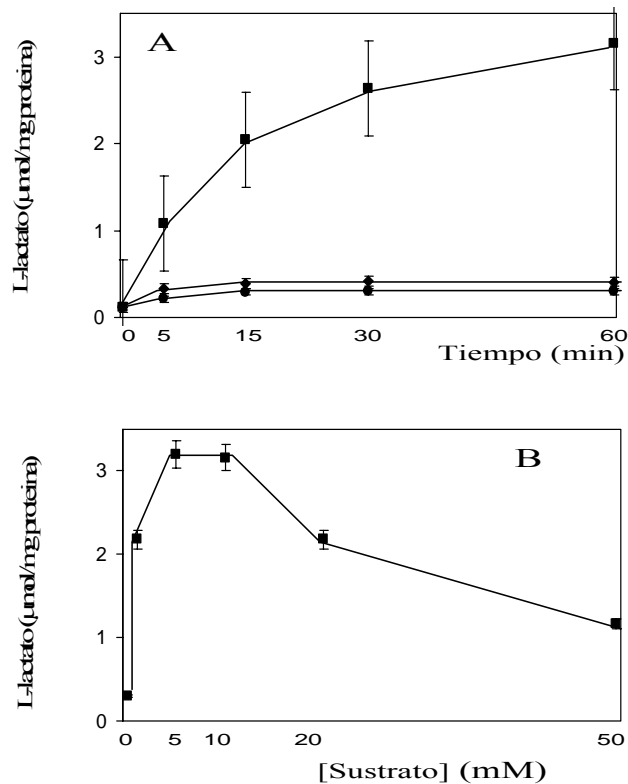


Figura 2

Figura 2. Efecto dependiente del tiempo y la concentración del citrato sobre los niveles extracelulares de L-lactato en espermatozoides frescos de cerdo. A: Espermatozoides fueron incubados en ausencia de cualquier sustrato energético (●) o en la presencia de 10 mM de citrato (■). Además, células fueron también incubadas con 10 mM de citrato y 10 mM ácido fenilacético juntos (◆). A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas para determinar los niveles extracelulares de L-lactato. B: Los espermatozoides fueron incubados por 60 minutos con crecientes concentraciones de citrato (■) luego se tomaron alícuotas para determinar los niveles extracelulares de L-lactato. Los resultados muestran las medias \pm S.E.M. de 8 diferentes experimentos.

3.3. Efectos de la incubación con L-lactato y citrato sobre las concentraciones intracelulares de glucosa 6-fosfato y de glucógeno y los niveles extracelulares de glucosa.

Los espermatozoides de cerdo no mostraron niveles detectables de G 6-P bajo ninguna de las condiciones utilizadas en este estudio. Igualmente, no se detectó la presencia de glucosa extracelular en ninguna de las condiciones experimentales de este estudio (datos no mostrados). Por otro lado, los espermatozoides de las muestras de semen frescas tenían una concentración intracelular de glucógeno de $56,2 \pm 3,5$ nmol glucosa/mg de proteína (Figura 3A). Estos valores decrecían hasta $41,8 \pm 1,1$ nmol de glucosa/mg de proteína tras 60 minutos de incubación en un medio carente de sustratos energéticos. La adición de de tanto citrato 10 mM como lactato 10 mM neutralizó este descenso a lo largo de el tiempo de incubación, con niveles de glucógeno que alcanzaron valores de $57,3 \pm 3,9$ nmol de glucosa/mg de proteína y $54,7 \pm 5,4$ nmol/mg de proteína tras 60 minutos de incubación en presencia de citrato y de lactato, respectivamente (Figura 3A). Por otra parte, el efecto de ambos sustratos sobre los niveles intracelulares de glucógeno también fue dosis-dependiente. Así, se alcanzo un efecto máximo para ambos sustratos tras la incubación durante 60 minutos a una concentración 50 mM de citrato y 50 mM de lactato (Figura 3B).

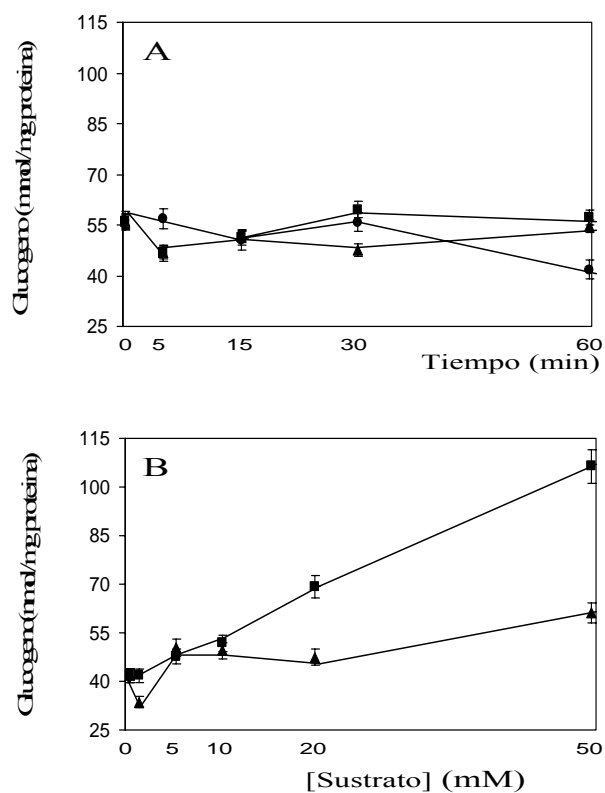


Figura 3

Figura 3. Efecto dependiente del tiempo y dependiente de la concentración del citrato y del L-lactato sobre los niveles intracelulares de glicógeno contenido in espermatozoides frescos de cerdo. A: Los espermatozoides fueron incubados en ausencia (●) o en presencia de 10 mM de citrato (■) o de 10 mM L-lactato (▲) a los tiempos indicados, alícuotas se tomaron para determinar los niveles intracelulares de glicógeno B: Los espermatozoides fueron incubados por 60 minutos con concentraciones crecientes de citrato (■) o L-lactato (▲) y alícuotas se tomaron para determinar la concentración intracelular de glicógeno. Los resultados muestran las medias \pm S.E.M. de 8 diferentes experimentos.

3.4. Efectos de la incubación con L-lactato y citrato en los niveles intracelulares de ATP.

Los niveles intracelulares de ATP en los espermatozoides de cerdo mostraron ser muy sensible a la falta de fuentes de energía externas. Tal y como se observa en la Figura 4A, los niveles de ATP disminuyeron de $9,2 \pm 1,2$ nmol/mg de proteína al inicio de la incubación hasta $1,6 \pm 0,4$ nmol/mg de proteína tras 60 minutos de incubación en un medio carente de citrato o lactato. La adición de uno de ambos sustratos indujo incremento intenso y muy rápido de los niveles de ATP, alcanzando valores máximos tras sólo 30 segundos de incubación con 10 mM de citrato o lactato (Figura 4A). Después de este periodo de tiempo, el nivel de ATP disminuyó progresivamente, mostrando valores de $10,9 \pm 2,1$ nmol/mg de proteína y $9,3 \pm$ nmol/mg de proteína tras 60 minutos de incubación con citrato y lactato, respectivamente (Figura 4A). Hay que destacar el hecho que los niveles de ATP después de 60 minutos de incubación con citrato y lactato eran en todos los casos muy superiores a aquellos observados tras la incubación durante 60 minutos sin sustratos energéticos.

Como en los parámetros metabólicos anteriores, también se observó efecto dependiente de la dosis de citrato y lactato sobre los niveles intracelulares de ATP. Así, se la concentración de ATP se incrementó después de 15 minutos de incubación de manera proporcional al incremento de la concentración de citrato (Figura 4B). Por otro lado, en presencia de 50 mM de lactato los valores de ATP fueron más bajos ($10,0 \pm 0,8$ nmol/mg de proteína) que los obtenidos con 10mM de lactato ($13,4 \pm 0,7$ nmol/mg de proteína, ver Figura 4B), lo que podría indicar un posible efecto tóxico del lactato a las concentraciones más elevadas utilizadas.

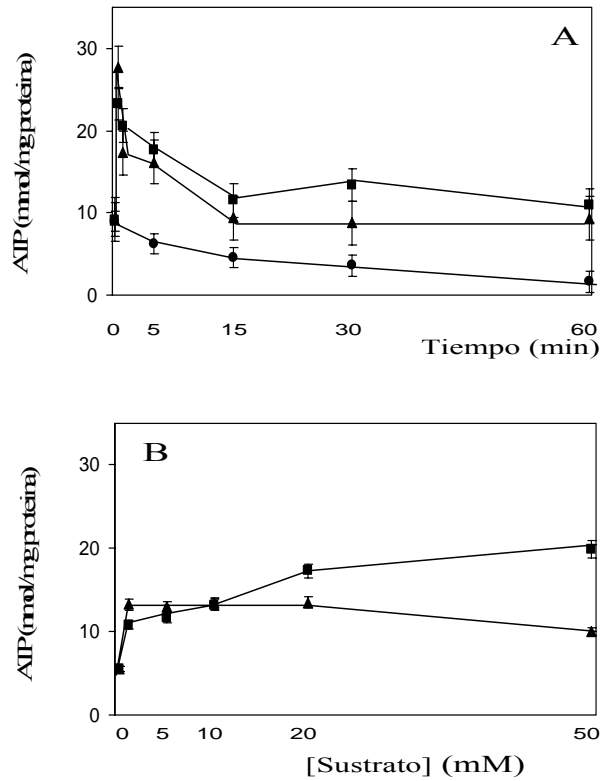


Figura 4

Figura 4. Efecto dependiente del tiempo y la concentración del citrato y del L-lactato sobre los niveles intracelulares de ATP en espermatozoides frescos de cerdo. A: Los espermatozoides fueron incubados en ausencia (●) o en presencia de 10 mM citrato (■) o de 10 mM L-lactato (▲) y, a los tiempos indicados, alícuotas se tomaron para determinar los niveles intracelulares de ATP. B: Los espermatozoides fueron incubados por 15 minutos con concentraciones crecientes de citrato (■) o de L-lactato (▲) y luego se tomaron alícuotas para determinar la concentración intra celular de ATP. Los resultados muestran las medias \pm S.E.M. de 8 diferentes experimentos.

3.5. Efecto de la incubación con L-lactato y citrato en la producción de CO₂.

La incubación de espermatozoides de cerdo con concentraciones crecientes de [¹⁴C] lactato indujo un incremento dosis-dependiente en los niveles extracelulares de ¹⁴CO₂, el cual alcanzó valores máximos (48,1±6,7 nmol/mg de proteína) tras la incubación durante 60 minutos con lactato 50 mM (Figura 5). Un efecto similar fue observado tras incubarse con [¹⁴C] citrato, aunque en este caso las concentraciones más bajas del sustrato inducían niveles de CO₂ inferiores a los obtenidos con lactato. Sin embargo, a concentraciones más altas de citrato, la producción de CO₂ alcanzó valores similares a los producidos con lactato (Figura 5).

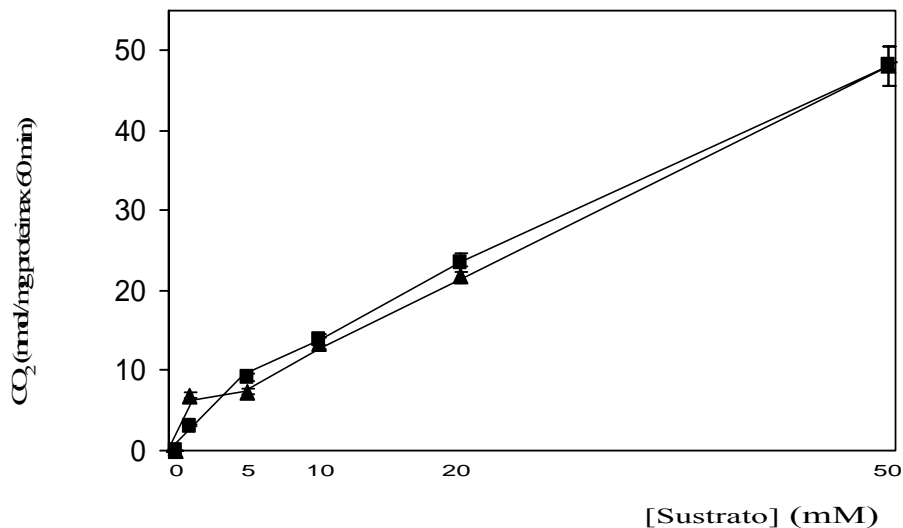


Figura 5

Figura 5. Efecto dependiente de la concentración del citrato y del L-lactato sobre el ritmo de producción de CO₂. Los espermatozoides fueron incubados por 60 minutos con concentraciones crecientes de citrato (■) o de L-lactato (▲) luego se tomaron alícuotas para determinar la formación extracelular de CO₂. Los resultados muestran las medias±S.E.M. de 8 diferentes experimentos.

3.6. Comportamiento cinético de la actividad lactato deshidrogenasa total de espermatozoides de cerdo.

Los sobrenadantes y los sedimentos resuspendidos obtenidos de espermatozoides de cerdo homogenizados mostraron una cinética de la LDH total muy diferente en cada caso. Así, los sobrenadantes mostraban un incremento progresivo en la actividad LDH en presencia de concentraciones de lactato que iban desde 0,1 mM a 50 mM, alcanzando valores máximos (102,2±3,4 IU /mg de proteína) a 50 mM (Figura 6A). Por el contrario, los sedimentos resuspendidos mostraron una actividad LDH mucho más baja, y de hecho no se detectó ninguna actividad enzimática perceptible a las concentraciones de lactato de 0,05mM a 0,1mM (Figura 6A). A concentraciones mas altas de lactato, la actividad LDH de los sedimentos resuspendidos mostró un aumento notable, primero entre 0,5 mM y 1mM del sustrato, y luego un aumento más progresivo, alcanzando valores máximos de actividad (22,3±3,4 IU /mg de proteína) a 50 mM de lactato (Figura 6A).

La representación de Lineweaver-Burke de la actividad LDH tanto en sobrenadantes como en sedimentos resuspendidos reflejó las diferencias en la cinética LDH aún con mayor claridad (ver Figura 6B). Nuestros resultados indican que los sobrenadantes presentaban una sola actividad LDH, de aspecto lineal y con una Km teórica de 0,51 mM. En cambio, los sedimentos resuspendidos presentaban, en apariencia, dos

actividades LDH lineales separadas. La primera se detectó a concentraciones de lactato entre 0,5 mM y 1mM, mostrando una Km teórica de 15 mM. La segunda, apreciable a concentraciones de lactato entre 2mM y 50mM, tenía una Km teórica de 5,9 mM (Figura 6B). Sin embargo, es importante notar que la primera actividad lineal calculada en los sedimentos resuspendidos se calculó a partir de sólo 2 concentraciones de sustrato, puesto que no se pudo detectar ninguna actividad LDH perceptible por debajo de 0,5 mM de lactato, como indicamos anteriormente. Por consiguiente, la Km teórica en este caso solo puede asumirse como una aproximación, y posiblemente esta línea cinética podría integrarse en la otra. En este caso, la nueva Km teórica para la cinética lineal integrada en sedimentos resuspendidos fue de 6,9 mM (datos no mostrados).

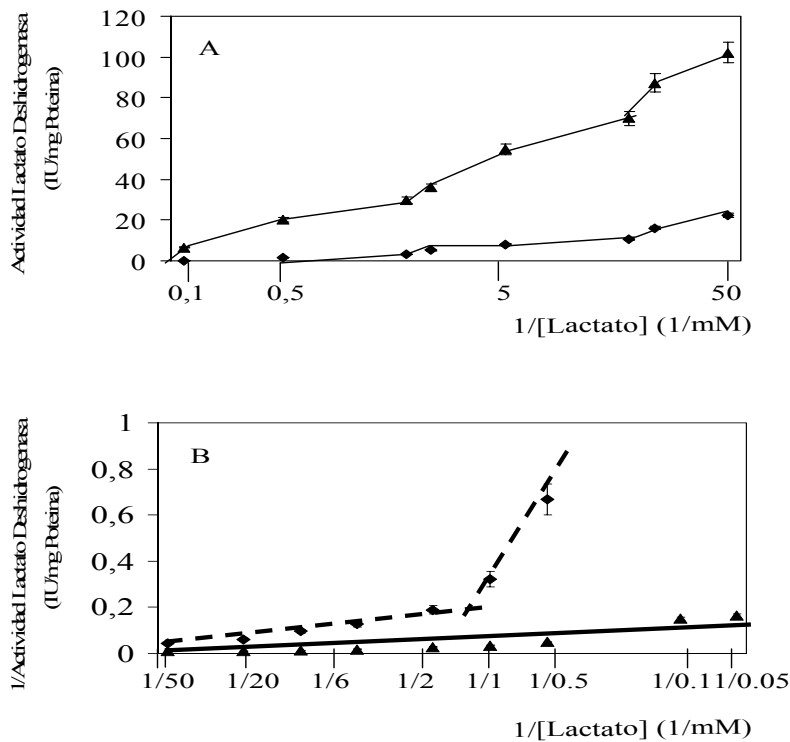


Figura 6

Figura 6. La cinética de la actividad lactato dehidrogenasa total en extractos espermáticos de cerdo. A: Relación entre la actividad lactato dehidrogenasa total y la concentración de L-lactato en sobrenadantes (▲) y sedimentos resuspendidos (◆) de extractos espermáticos de cerdo. B: La representación semi-logarítmica entre los valores inversos de la actividad lactato dehidrogenasa total y la concentración de L-lactato en sobrenadantes (▲) y sedimentos resuspendidos (◆) de extractos espermáticos de cerdo. Las líneas muestran los aparentes tipos de actividad de lactato dehidrogenasa de los sobrenadantes (línea continua) y sedimentos resuspendidos (línea discontinua) revelado por esta representación. Los resultados muestran las medias±S.E.M. de 8 diferentes experimentos.

3.7. Determinación de la presencia de lactato dehidrogenasa específica de espermatozoides en el espermatozoide de cerdo.

El análisis mediante Western blot de extractos espermáticos de cerdo y perro mostraron la presencia de una banda que reaccionaba específicamente contra un anticuerpo anti-LDH específica de espermatozoides de aproximadamente 35 Kda, lo que concuerda con lo publicado antes en humanos (Gupta y Kang, 2000; ver figura 7). Hay que destacar que dicha banda apareció tanto en los extractos de sobrenadantes como en los de sedimentos espermáticos resuspendidos (Figura 7). Por otro lado, el análisis inmunocitoquímico utilizando el mismo anticuerpo en sobre espermatozoides de cerdo mostró una reacción positiva en la pieza principal de la cola, juntamente a una señal débil localizada en la pieza intermedia (Figura 8). Estos datos indican que la LDH específica de espermatozoide se encuentra localizada principalmente en la pieza principal de la cola del espermatozoide de cerdo.

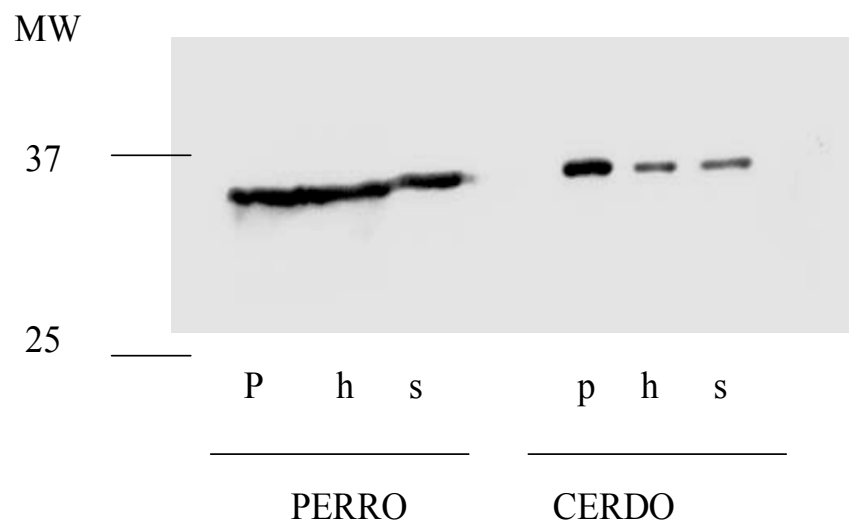


Figura 7

Figura 7. Los Western blot anti LDH espermática específica, de los extractos espermáticos de cerdo. La Figura muestra un Western blot representativo obtenido de sobrenadantes (s), sedimentos resuspendidos (p) y extractos totales (h) de perro (DOG) y cerdo (BOAR) homogenizados obtenidos de muestra fresca. MW: Peso molecular. El número total de diferentes réplicas para estos Western blot fue de 5.

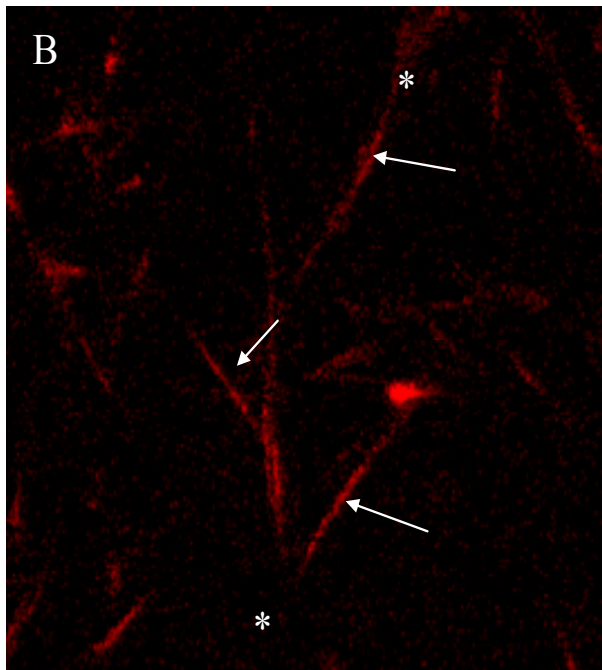
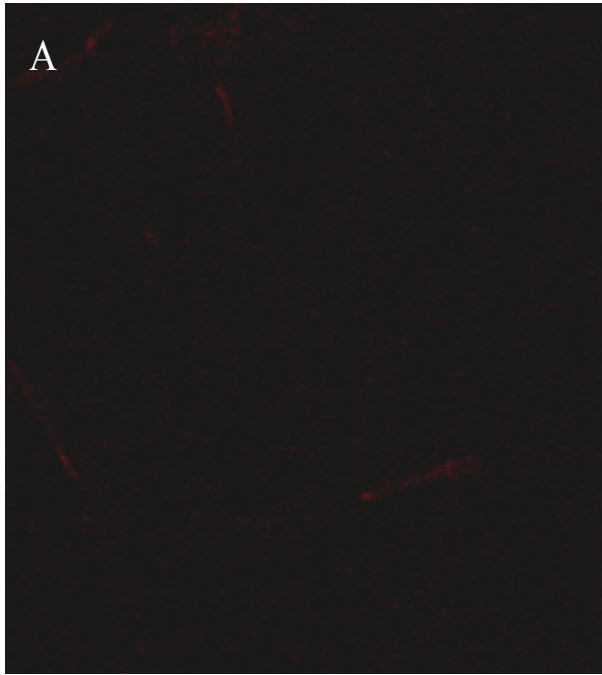


Figura 8

Figura 8. La inmunocitoquímica de cerdo, lactato deshidrogenasa esperma específica. La figura muestra imágenes representativas de espermatozoides de cerdo con un anticuerpo inmunolocalizando, la lactato deshidrogenasa esperma específica. A: Control negativo. B: células frescas, muestras control. El número total de réplicas independientes para estos experimentos fue de 5. Las imágenes tienen un aumento de 75. Las flechas indican la pieza principal de la cola, y los asteriscos indican la cabeza de los espermatozoides.

3.8. Efecto de la incubación con L-lactato y citrato en el patrón de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina.

Tal y como se muestra en la Figura 9, la fosforilación en residuos de tirosina de homogenizados completos de espermatozoides porcinos mostró un patrón específico, con una banda de fosforilación predominante de unos 45 KDa (Figura 9). La incubación con 10mM de citrato o 10 mM de lactato indujo un aumento notable en la intensidad de todas las bandas, y especialmente, de la ya citada de 45 KDa. No obstante, no se apreció ningún cambio significativo en el patrón específico de fosforilación en tirosinas tras la incubación con ninguno de los dos sustratos (Figura 9).

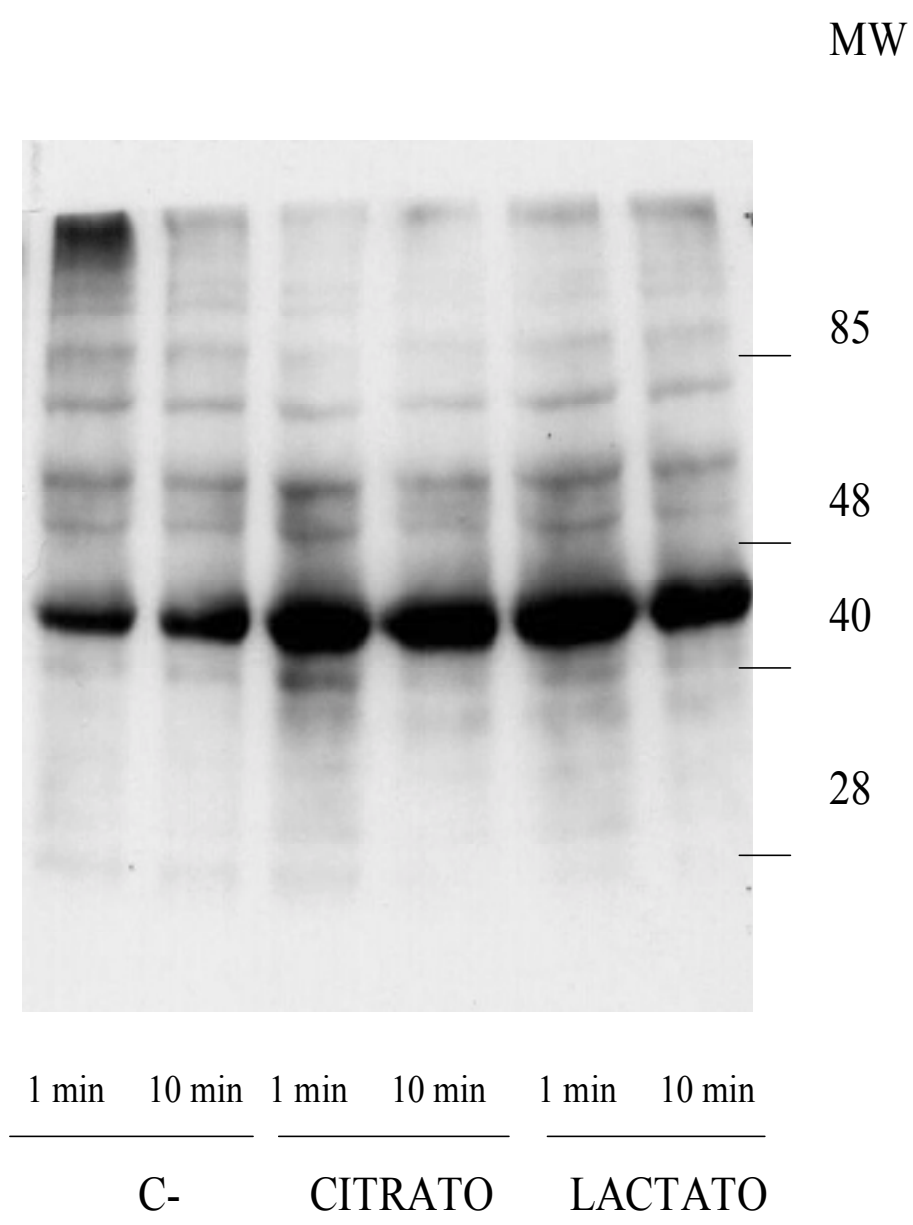


Figura 9

Figura 9. Los patrones de fosforilación de la tirosina de espermatozoides de cerdo incubados con 10 mM de citrato o 10 mM de L-lactato. Alícuotas fueron colectadas a los tiempos indicados para determinar los patrones de fosforilación de la tirosina luego se realizo un análisis Western blot con un anticuerpo anti-ratón tirosinafosforilada. La cantidad total de proteína analizada en cada línea fue de 30 µg. La Figura muestra un Western blot representativo de 5 replicas independientes. C: muestras incubadas sin substratos energéticos CITRATE: células incubadas con 10 mM de citrato. LACTATE: espermatozoides incubados con 10 mM L-lactato. MW: Peso molecular.

4. DISCUSIÓN.

Nuestros resultados muestran claramente que los espermatozoides de cerdo provenientes de eyaculados frescos utilizan eficazmente el citrato y el lactato, como única fuente de energía en ausencia de otros sustratos energéticos, tal y como lo refleja el aumento de los niveles intracelulares de ATP inducido por ambos sustratos. Esta utilización ya ha sido descrita anteriormente (Calvin y Tubos, 1978; Jones, 1997), llevándose a término a través de la metabolización de ambos sustratos a través del ciclo de Krebs, tal y como demuestran los estudios sobre el ritmo de producción de CO₂. Otro resultado que refuerza esta aserción es el hecho que la inhibición de la actividad anapletórica piruvato carboxilasa evita la formación de lactato producido a partir del citrato. Esta inhibición indica claramente que el citrato es metabolizado a través del ciclo de Krebs, y que de los productos finales de su metabolización son el lactato y el CO₂. Además, nuestros resultados indican que la metabolización de lactato y citrato mantiene los niveles intracelulares de ATP dentro de límites muy similares a aquellos presentes en espermatozoides recién obtenidos. Este resultado sugiere que tanto el

lactato como el citrato pueden ser utilizados por los espermatozoides de cerdo para mantener sus funciones básicas en ausencia de otros sustratos exógenos con un mayor potencial energético como la glucosa o la fructosa (Jones y Connors, 2000; Marín et al., 2003). Así, la estrategia metabólica del espermatozoide de cerdo está diseñada para optimizar su eficiencia basándose en el uso de todos aquellos posibles sustratos energéticos, tanto exógenos como endógenos, que pudiera encontrar durante su tránsito por el tracto genital de la hembra.

En un trabajo anterior, Jones indicó que el lactato consumido por el espermatozoide porcino entra en el ciclo de Krebs a través de una vía directa que no necesita su conversión en piruvato (Jones, 1997). Además, esta vía directa no sólo produce energía si no que también permite generar potencial reductor mediante la regeneración de NAD^+ hacia NADH (Jones, 1997). Nuestros resultados, tanto los determinados en parámetros metabólicos como en otros más generales como los porcentajes de viabilidad y acrosomas alterados, concuerdan con estas observaciones. Además, esta hipótesis también permite explicar los resultados observados en los estudios sobre el consumo de citrato. De hecho, nuestros resultados indican que el citrato puede metabolizarse a través de dos vías complementarias: La primera, a través de una metabolización directa por el ciclo de Krebs, lo que conlleva la producción de CO_2 y ATP. La segunda, a través de una vía indirecta que a su vez se desdoblaría en dos pasos: El primero, que involucra la entrada del citrato al ciclo de Krebs, y el segundo que conlleva el paso de los metabolitos del ciclo de Krebs derivados del citrato a través punto de control anapletórico modulado por la piruvato carboxilasa. Este paso provocaría la formación de cantidades significativas lactato, el cual sería a su vez enviado al medio extracelular y reincorporado de nuevo a la célula. Este lactato reincorporado sería, a su vez, nuevamente consumido a través del ciclo de Krebs, modulando esta introducción la

actividad LDH. A primera vista, el significado exacto de este complicado proceso de utilización del citrato no se entiende con facilidad. Sin embargo, sí se puede formular una explicación plausible a este proceso si consideramos que el mantenimiento de un preciso equilibrio intracelular de NAD^+/NADH es muy importante para la estabilización la funcionalidad espermática (Baker y Airen, 2004). Así, la formación de lactato a partir de citrato tiene como una de sus consecuencias la regeneración de, como mínimo, 2 moléculas de NAD^+ por cada molécula de citrato que pasa a través de la vía de la piruvato carboxilasa. De esta manera, el citrato puede ser utilizado no sólo como fuente de energía si no como también como un sistema factible para restablecer y estabilizar el equilibrio redox de los espermatozoides de cerdo en las condiciones estudiadas.

La complejidad de los mecanismos relativos a la metabolización del lactato y el citrato revelan la importancia que tiene el control de la actividad LDH en el mantenimiento de la funcionalidad de los espermatozoides de cerdo. Por lo tanto, la entrada de lactato al ciclo de Krebs a través del paso catalizado por la LDH, requiere una compleja regulación que permita modular de manera muy estricta el metabolismo del citrato y el lactato. Hay que señalar que los espermatozoides de mamífero presentan una isoforma de LDH específica, tal y como se ha descrito en diversas especies (Coronel et al., 1983; Pan et al., 1983; Pawloski y Brinkmann, 1992; Jones, 1997). En el caso específico del espermatozoide de cerdo, se ha demostrado que dicha isoforma espermática específica es la forma de LDH más importante presente en la célula, y por consiguiente se ha postulado que esta isoforma es la más importante para regular el metabolismo del lactato (Jones, 1997). Nuestros resultados del análisis de la inmunocitoquímica concuerdan con este postulado, ya que también se observa un isotipo de LDH específico de esperma, que se localiza principalmente en la pieza principal de la cola. No obstante, el estudio de la cinética enzimática indica que la actividad LDH de los espermatozoides de cerdo

presenta una conducta más compleja de lo esperado para una sola isoforma, puesto que se detecta una actividad LDH con una afinidad alta por el lactato y otra con una afinidad mucho más baja. Centrándonos en la isoforma de alta afinidad, que presenta una K_m estimada de 0,51 mM, parece lógico suponer que podría corresponder a la actividad asociada con la LDH específica de espermatozoides, dado que es la actividad más importante, lo que se correspondería con el hecho de que prácticamente la única LDH detectada mediante técnicas inmunocitoquímicas en espermatozoides de cerdo es precisamente la específica de espermatozoide (Jones, 1997). Otro detalle importante es el hecho que la LDH de alta afinidad aparecía únicamente en la fracción soluble de los espermatozoides, indicando así que la proteína responsable de esta actividad se encuentra en forma libre o asociada sólo débilmente a estructuras no solubles del espermatozoides como el axonema, las mitocondrias o el núcleo. Por el contrario, la cinética LDH de baja afinidad, con una K_m estimada estaba entre 5,9 mM y 6,9 mM, aparecía estrechamente asociada a una estructura espermática no soluble sin identificar, ya que dicha cinética sólo se evidenció en los sedimentos resuspendidos de los extractos de espermatozoides de cerdo. Por lo tanto, a primera vista nuestros resultados parecerían indicar que el espermatozoide de cerdo presenta, por lo menos, dos isoformas diferentes de LDH. Sin embargo, esto no tiene por qué ser así, puesto que la presencia de más de una actividad enzimática no implica necesariamente la presencia de más de una proteína para catalizar esta actividad. De hecho, la detección inmunológica de LDH específico de espermatozoide tanto en los sobrenadantes como en los sedimentos resuspendidos apoyan la hipótesis de que los espermatozoides de cerdo tienen una sola isoforma de LDH, específica de espermatozoide, que cambia su actividad cinética dependiendo de la estructura espermática con la que esté asociada. De esta manera, la LDH libre o débilmente asociada con el axonema, núcleo o vaina mitocondrial presentaría una

conducta cinética diferente de la misma proteína asociada estrechamente a alguna de estas estructuras. De hecho, cambios así ya se han descrito en sistemas como los espermatozoides de perro, en donde la glucógeno sintasa modifica su actividad, por lo menos parcialmente, mediante cambios de localización espacial después de la activación a través de la incubación mediada por glucosa y fructosa (Palomo et al., 2003). Por lo tanto, un mecanismo similar podría explicar los resultados observados en la LDH de espermatozoide de cerdo.

En todo caso, ya exista una o varias isoformas de la LDH, el resultado funcional es la presencia de por lo menos dos actividades LDH de cinética diferente en espermatozoides de cerdo. De hecho, la presencia de más de una actividad cinética para una sola enzima no es rara en células eucarióticas. Centrándonos en el metabolismo energético espermático, ya se observó este fenómeno en la actividad hexoquinasa en espermatozoides de perro (Fernández-Novell et al., 2004) y en los transportadores de hexosas como GLUT-3, GLUT-5 y SGLT-1 en varias especies de mamíferos (Angulo et al., 1998; Rigau et al., 2002). El caso de la hexoquinasa del espermatozoide de perro puede servir para entender la LDH de cerdo, ya que se observaron dos cinéticas de hexoquinasa diferentes, una con una afinidad muy alta por glucosa y otra con una afinidad mucho mas baja, que sólo se localizó en forma soluble (Fernández-Novell et al., 2004). La existencia de dos actividades enzimáticas con una K_m muy diferente para un mismo sustrato puede explicarse desde el punto de vista de la regulación metabólica. Así, un sistema similar es empleado por el hígado y el páncreas para controlar y detectar las variaciones en el nivel de glucosa extracelular, pudiendo adaptar así los flujos energéticos y el metabolismo global de la insulina a estos cambios (Cárdenas et al., 1998). Se ha propuesto un papel similar para las actividades hexoquinasa separadas detectadas en el perro (Fernández-Novell et al., 2004). Siguiendo esta explicación, la

actividad LDH con una K_m elevada puede actuar como un detector muy sensible a cambios en los niveles de lactato, lo que a su vez optimizaría el uso de este sustrato dependiendo de la concentración y de su fuente de origen.

Nuestros resultados también indican que tanto el citrato como el lactato inducen una activación funcional general los espermatozoides de cerdo. Esta aseveración se puede deducir a partir del aumento observado en la intensidad de la fosforilación en los residuos de tirosina que siguió a la incubación con ambos sustratos. Hay que destacar que este aumento no parece ser específico, puesto que ni el citrato ni el lactato incrementan de manera específica la fosforilación de alguna banda en concreto. Este resultado implica que el aumento global en la fosforilación de tirosina es el resultado de un incremento en la disponibilidad energética inducido tanto por el lactato como por el citrato más que una acción específica de los sustratos sobre la activación de una tirosina quinasa concreta. Estos resultados son diferentes de los observados en otras especies y sustratos, como los espermatozoides de perro incubado con glucosa y fructosa (Rigau et al., 2002). Sin embargo, la falta de un efecto específico inducido por lactato o citrato en la fosforilación de tirosina no es muy sorprendente, puesto que el aumento global observado puede relacionarse con el aumento concomitante en los niveles intracelulares de ATP que se observaron después de la incubación con el efector. Así pues, nuestros resultados muestran que el citrato y el lactato causan una activación general de la función espermática en el espermatozoide de cerdo mediante un mecanismo relacionado con el aumento en los niveles de ATP inducidos por la utilización de ambos sustratos.

En conclusión, los resultados de este estudio indican que los espermatozoides de cerdo metabolizan de manera muy eficaz tanto el citrato como el lactato a través de una vía metabólica regulada por la actividad LDH. Esta metabolización permite obtener energía suficiente para mantener e incluso aumentar la funcionalidad espermática general.

Finalmente, la actividad LDH en espermatozoides porcinos presenta dos actividades cinéticas distintas con afinidad diferente por el lactato, las cuales se sitúan en localizaciones separadas dentro de la célula.

5. AGRADECIMIENTOS.

Agradecemos a la Sra. Raquel García-Olivas (Servei Científic-Tècnic; Parc Científic de Barcelona, Universidad de Barcelona) por su ayuda en la obtención de las imágenes con el microscopio confocal láser. El manuscrito se ha financiado gracias a la concesión del Proyecto AGL2001-2568 del Ministerio de Ciencia y Tecnología (España).

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angulo C, Rauch MC, Droppelmann A, Reyes AM, Slebe JC, Delgado-López F, Guaiquil VH, Vera JC, Concha II. Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa: cellular localization and transport of hexoses and vitamin C. *J Cell Biochem.* 1998;71:189-203.
- Bahl JJ, Matsuda M, DeFronzo RA, Bressler R. In vitro and in vivo supression of gluconeogenesis by inhibition of pyruvate carboxylase. *Biochem Pharmacol.* 1997;53:64-67.
- Baker MA, Aitken RJ. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;216:47-54.
- Ballester J, Fernández-Novell JM, Rutllant J, García-Rocha M, Palomo MJ, Mogas T, Peña A, Rigau T, Guinovart JJ, Rodríguez-Gil JE. Evidence for a functional glycogen metabolism in mature mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Develop.* 2000;56:207-219.

- Bamba, K. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology*.1988;29:1245-1251.
- Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-254.
- Burnett WN. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated proteins. *J Anal Biochem*. 1981;112:195-203.
- Calvin J, Tubbs PK. Mitochondrial transport processes and oxidation of NADH by hypotonically –treated boar spermatozoa. *Eur J Biochem*. 1978;89:315-320.
- Cárdenas ML, Cornish-Bowden A, Ureta T. Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1401:242-264.
- Coronel CE, Burgos C, Pérez de Burgos NM, Rovai LE, Blanco A. Catalytic properties of the sperm-specific lactate dehydrogenase (LDH X or C4) from different species. *J Exp Zool*. 1983;225:379-385.
- Fernández-Novell JM, Ballester J, Medrano A, Otaegui PJ, Rigau T, Guinovart JJ, Rodríguez-Gil JE. The presence of a high-K_m hexokinase activity in dog, but not in boar, sperm. *FEBS Lett*. 2004;570:211-216.
- Gupta SS and Kang BP. Molecular and kinetic properties of sperm specific LDH after radiation inactivation. *Mol Cell Biochem*. 2000;206:27-32.
- Jones AR, Chantrill LA, Cokinakis A. Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1992;94:129-134.
- Jones AR. Metabolism of lactate by mature boar spermatozoa. *Reprod Fertil Develop*. 1997;9:227-232.

- Jones AR, Connor DE. Fructose metabolism by mature boar spermatozoa. *Reprod Fertil Develop*. 2000;12:355-359.
- Lambrecht M, Transtschold D. ATP determination with hexokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase. In: Bergmeyer UH, ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie; 1984: 543-551.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-685.
- Marín S, Chiang K, Bassilian S, Lee W-N P, Boros LG, Fernández-Novell JM, Centelles JJ, Medrano A, Rodríguez-Gil JE, Cascante M. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Lett*. 2003;554:342-346.
- Michal G. Glucose 6-phosphate. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie; 1984: 191-197.
- Noll, F. L-lactate. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie; 1984: 582-588.
- Palomo MJ, Fernández-Novell JM, Peña A, Guinovart JJ, Rigau T and Rodríguez-Gil JE. Glucose- and fructose-induced dog-sperm glycogen synthesis shows specific changes in the location of the sperm glycogen deposition. *Mol Reprod Develop*. 2003;64:349-359.
- Pan YC, Sharief FS, Okabe M, Huang S, Li SS. Amino acid sequence studies on lactate dehydrogenase C4 isozymes from mouse and rat testes. *J Biol Chem*. 1983;258:7005-7016.
- Pawlowski R, Brinkmann B. Evaluation of sperm specific lactate dehydrogenase isoenzyme C4 (LDH C4): application to semen detection in stains. *Int J Legal Med*. 1992;105:123-126.

- Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology*. 2004;61:673-690.
- Rigau T, Rivera M, Palomo MJ, Fernández-Novell JM, Mogas T, Ballester J, Peña A, Otaegui PJ, Guinovart JJ, Rodríguez-Gil JE. Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. *Reproduction*. 2002;123:579-591.
- Wahlefeld AW (1984) LDH activity: UV-method with L-lactate and NAD. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie; 1984: 126-133.

VARIATIONS IN THE PROPORTION OF GLYCOLYTIC/NON-GLYCOLYTIC ENERGY SUBSTRATES MODULATE SPERM QUALITY IN DILUTED BOAR SAMPLES STORED AT 15°C-17°C

A Medrano, A Peña, T Rigau and JE Rodríguez-Gil*

Unit of Animal Reproduction. Dept. Animal Medicine and Surgery. School of Veterinary Medicine. Autonomous University of Barcelona. E-08193 Bellaterra. Spain

*To whom all correspondence should be submitted

Correspondence address: Joan E. Rodríguez-Gil. Unit of Animal Reproduction. Dept. Animal Medicine and Surgery. School of Veterinary Medicine. Autonomous University of Barcelona. E-08193 Bellaterra. Spain.

Phone: 34-935811045

Fax: 34-935812006

E-mail: juanenrique.rodriguez@uab.es

Running Title: Energy modulation of conservation of boar sperm

Autonomus University of Barcelona, Bellaterra, Spain

Reproduction in Domestic Animal; In press (2005)

SUMMARY

In this work the role of energy substrates in the maintenance of boar-sperm survival during storage at 15°C-17°C was tested. For this purpose, boar spermatozoa were stored at 15°C-17°C in several defined media with separate combinations of a monosaccharide, glucose, and a non-monosaccharide, either citrate or lactate, energy substrates. Our results indicate that the medium containing the highest concentration of glucose together with low lactate levels was the most suitable to maintain sperm quality for 168 h at 15-17°C. This was confirmed after observation of the results of the percentages of viability and altered acrosomes, the Osmotic Resistance Test, the Hyperosmotic Resistance Test (HRT) and the rhythm of L-lactate production. It is noteworthy that the survival ability of boar sperm was greater in this experimental medium than in the standard Beltsville Thawing Solution (BTS) extender, which contains only glucose as an energy substrate, although at a concentration far higher than that of all of the tested experimental media. Our results indicate that the exact composition, more than the pure quantity of energy substrates, is a very important modulatory factor which affects survival ability of boar sperm in refrigeration. Thus, the exact combination of several energy substrates would have to be taken into account when optimizing the design of commercial extenders to store boar spermatozoa at 15°C-17°C.

1. INTRODUCTION

Artificial insemination (AI) is one of the most important factors that underlies the rapid expansion that pig farming has undergone in the last several years in occidental countries. The extensive utilization of AI in pig farming is a consequence of the development of efficient techniques to store boar sperm in refrigeration enough time to make this technique practical under an economic point of view. Thus, in the last several

years a very wide range of commercial extenders to optimally conserve boar semen at 15°C-17°C has been developed to fulfill market necessities (see Gadea, 2003 as a review). On a general basis, all commercial extenders are designed to accomplish a series of minimal requirements needed for optimal boar-sperm survival. One of the most important of these requirements is the presence of a feasible energy source, which allows sperm to maintain its basal functions during the time required. In this way, the most utilized energy source in refrigerated extenders is glucose, which is added to very high concentrations (between 100 mM and 200 mM, see Gadea, 2003 for some examples), much above those as mammalian sperm achieve its greater energy metabolism activity (in the range of 5 mM-10 mM, see Rigau et al., 2002; Marín et al., 2004; and Medrano et al., 2004 as examples). Moreover, commercial extenders have some other substances that can be utilized by boar sperm as energy sources. The most important of these is citrate, which is utilized for the maintenance of both osmolarity and pH (Gadea, 2003), although boar sperm is able, too, to consume it through the Krebs cycle (Calvin and Tubbs, 1978). In fact, all of these data suggest that the use of a concrete energy source at a specific concentration in a commercial extender is based mainly on an empirical basis, which makes further optimization of these extenders based on a better use of the energy sources added to the solution difficult.

In fact, boar sperm has a complex system to optimize its energy levels, through a sophisticated regulation of its energy fluxes. Thus, cells from fresh ejaculates show a great predominance to consume monosaccharides through the glycolytic flux, with less than 1% of the energy obtained in these conditions from glucose coming from the Krebs cycle (Marín et al., 2004). However, boar-sperm cells also show remarkable differences in their ability to consume a specific sugar, and, in this way, glucose is the monosaccharide more rapidly consumed through glycolysis when compared to others,

such as fructose, sorbitol and mannose (Medrano et al, 2004). These differences are strongly related to the sperm's ability to phosphorylate these sugars. In this manner, boar-sperm total hexokinase activity is more efficient to phosphorylate glucose than is fructose or mannose, thus entering glucose more rapidly through glycolysis (Medrano et al., 2004).

Notwithstanding, boar spermatozoa are also able to utilize non-hexose substances as energy substrates. Thus, lactate (Jones, 1997), glycerol (Jones et al., 1992) and the above-cited citrate (Calvin and Tubbs, 1978) can be used by boar sperm to obtain energy, although the energy obtained from these substrates is smaller than that from glucose. The utilization of non-hexose substrates raises the question of the metabolic pathway/s by which sperm can metabolize these substrates, since the main catabolic way of these cells, glycolysis, is not feasible for substances like lactate and citrate. In fact, citrate and lactate are directly metabolized through the Krebs cycle (Calvin and Tubbs, 1978, Jones, 1997). The conversion of the Krebs cycle in a marginal metabolic path in the presence of sugars into a key step in the presence of non-hexose energy substrates also raises the question as to how boar sperm controls the activity of the Krebs cycle to modulate its rhythm of flux. All of these questions highlight the great complexity involved in the control of energy management of boar sperm, which no longer has to be modulated by a single, one-step mechanism simply linked to the velocity of glycolytic flux.

From a practical point of view, the complex regulation of energy metabolism in boar sperm raises the question about the influence that the concentration and the specific type of energy substrates have in the ability to survive in an extender for refrigeration (15°C-17°C). This is important, since practically all of the commercial extender that are utilized at this moment include high concentrations of glucose as energy substrate, but

also many of them include citrate, not as an energy substrate, despite the fact that boar sperm can consume it. In fact, there is in the literature a lack of observations about how variations in the quantity and type of energy substrates can influence sperm survival. This is important, since this knowledge can aid developing an optimized design of the extenders for refrigerated storage by adjusting the concentration and the specific type of energy substrate utilized. Taking this into account, the main aim of the present work is to test how the specific composition of energy substrates can affect the survival ability of boar sperm at 15°C-17°C. For this, we designed 4 separate types of extenders with the same values of osmolarity and pH. All 4 experimental media had a combination of glucose and a non-hexose energy substrate, which could be citrate or L-lactate. Moreover, the glucose/citrate and glucose/L-lactate combinations were made in order to obtain one medium with high concentrations of the sugar and low concentrations of the non-hexose substrate, and another with low concentrations of glucose and higher concentrations of citrate or L-lactate. Boar sperm was maintained in these media for 168 h at 15°C-17°C. Moreover, another semen aliquot was diluted in a plain, Beltsville Thawing Solution (BTS) extender, specifically designed for boar-sperm conservation (Gadea, 2003), in order to have an external control of sperm survival. Semen quality was determined after using the parameters that previous articles have shown as being the most valid in our experimental and farming conditions (Quintero-Moreno et al., 2004, Rigau et al., 1996). Following this previously published information, the semen quality parameters utilized in this study were the percentages of viability and altered acrosomes, the Osmotic Resistance Test (ORT) and the Hyperosmotic Resistance Tests (HRT), as published in Quintero-Moreno et al. (2004), and the rhythm of L-lactate formation, as in Rigau et al. (1996).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Semen collection and processing

Boar semen was collected from six healthy, mature boars from a commercial farm (Servicios Genéticos Porcinos, S.L.; Roda de Ter, Spain). Boars were two Large White, three Pietrain x Large White and one Pietrain x White Belgium, which were 2-3 years old. The ejaculates were manually collected, and the obtained sperm-rich semen fractions were separated and immediately placed in a water bath at 37°C. At this time, a 1-mL aliquot was taken to evaluate the main semen characteristics of these sperm-rich fractions through a semen quality analysis, following the practical guidelines described in Quintero-Moreno et al. (2004). Quality characteristics of fresh, sperm-rich fractions of these ejaculates are shown in Table 1

Table 1. General characteristics of the utilized boar ejaculates

Concentration through analysis by hemocytometer chamber (10^6 sperm/mL)	795.5±32.7
Viability (%)	87.3±2.7
Altered acrosomes (%)	7.9±0.3
ORT (%)	81.5±3.5
HRT (arbitrary units)	0.94±0.02
Rhythm of L-lactate production ($\mu\text{mol}/60$ min x mg protein)	9.1±1.8
Total morphological abnormalities (%)	9.7±1.2
Head morphological abnormalities (%)	0.3±0.1
Neck and midpiece morphological abnormalities (%)	1.5±0.2
Tail morphological abnormalities (%)	0.9±0.1
Proximal cytoplasmic droplets (%)	2.9±0.3
Distal cytoplasmic droplets (%)	4.1±0.5

The semen quality parameters has been described in the Materials and Methods section.

Results are means±S.E.M. for 8 separate ejaculates. Afterwards, the sperm-rich

fractions were fractioned in 5 aliquots of equal volume, and each of these aliquots was diluted in the corresponding experimental extender or in BTS to a final concentration of 2×10^7 spermatozoa/mL in all cases. The composition of all of the utilized extenders is shown in Table 2.

Table 2. Characteristics of the utilized experimental extenders

Extender	BTS	A	B	C	D
Glucose (g/L)	37.00	18.00	27.02	18.00	18.00
KCl (g/L)	0.75	1.48	1.48	0.74	0.74
NaHCO ₃ (g/L)	1.25	-----	-----	-----	-----
Sodium lactate (g/L)	-----	-----	2.80	-----	13.44
Sodium citrate (g/L)	6.00	5.90	-----	23.52	-----
Base Tris Buffer (g/L)	-----	7.90	6.04	6.04	6.04
Ethylenediaminetetraacetic acid (g/L)	1.25	1.24	1.24	1.24	1.24
pH	7.2	7.8	7.8	7.8	7.8
Osmolarity (mOsm)	330	328	317	318	317

Diluted samples were distributed in 100-mL commercial AI recipients. Concentrations of samples were determined at 200x with either a Neubauer or Thoma hemocytometer chamber. One of the 100-mL doses for each extender was then placed in storage in a refrigerator at 15°C-17°C, whereas the remaining samples were discarded for further use. At the indicated times, a 1-mL aliquot of each extender was taken to evaluate the analyzed parameters.

2.2. Analytical procedures

Percentages of viability, altered acrosomes and, in fresh ejaculates, morphological abnormalities, were determined by using the Nigrosin-Eosin stain (Bamba, 1988). These percentages were determined after counting 200-300 spermatozoa per slide at 1,000x. Altered acrosomes were considered to be those which did not show a clear and uniform acrosomal ridge. Morphological abnormalities were classified according to their location in head, neck or midpiece, and tail abnormalities. Proximal and distal cytoplasmic droplets were counted as separate abnormalities.

The ORT was carried out as described by Rodríguez-Gil and Rigau (1995), whereas the HRT was performed as described in Quintero-Moreno et al. (2004). Following this, the HRT was based upon the attaining of the relationship between the percentages of viability of a semen sample subjected to a hyperosmotic medium and then further subjected to a sudden change from the hyperosmotic to an isoosmotic medium. This is expressed through the formula:

$$\text{HRT} = \text{VD}/\text{VU}$$

Where VD is the percentage of viability in the osmotically disrupted medium, an VU is the percentage of viability in the initial, hyperosmotic medium. Finally, the rhythm of L-lactate production was carried out following the procedure described in Rigau et al. (1996).

2.3. Statistical Analyses

All data recorded were analyzed by SAS/Statistical Analysis System from Windows (SAS, 1996). The putative significance of differences was calculated by two-way ANOVA, considering the BST-group as a co-variable

3. RESULTS

3.1. Time-dependent evolution of the percentages of viability and altered acrosomes of stored boar spermatozoa

Boar spermatozoa stored at 15°C-17°C in BTS extender showed a progressive decline in the percentage of viability depending on the time of storage. This decline was from 87.0%±5.3% at the start of the storage to 66.3%±4.7% after 168 h of conservation (Fig. 1A).

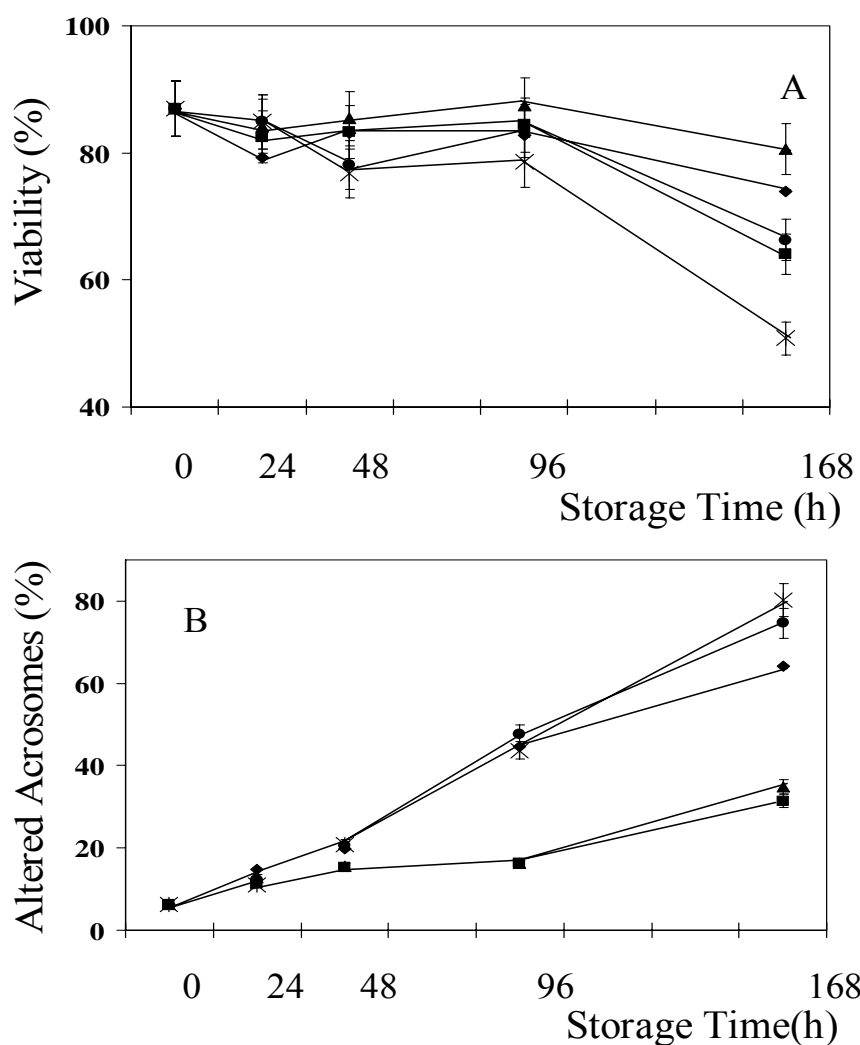


Figure 1. Effects of storage at 16°C-17°C in different media on the percentages of viability and altered acrosomes of boar sperm. Boar sperm were diluted in the BTS extender (●) or in the separate experimental A (■), B (♦), C (◆) and D (X) media, during the indicated times. Composition of separate media has been described in the Materials and Methods section. At the indicated times, the percentages of viability (A) and altered acrosomes (B) were determined in each point. Results are the means \pm S.E.M. of 8 separate experiments.

On the other hand, the tested experimental extenders showed different effects on this parameter. Thus, whereas boar sperm stored in ED suffered a very intense decline in viability, which reached $50.8\% \pm 4.0\%$ after 168 h (Fig. 1A), Extenders B and C had a better ability than BTS to maintain viability. In fact, Extender B showed a very great ability to maintain viability, and there was no significant decrease of this parameter after 168 h of storage, when compared with the fresh samples (Fig. 1A).

Concomitant results were determined after the observation of the time-dependent evolution of the percentage of altered acrosomes. Thus, as shown in Fig. 1B, sperm stored at 15-17°C in BTS experienced a progressive increase in this percentage, which went from $6.2\pm 1.4\%$ in fresh samples to $74.6\%\pm 5.0\%$ after 168 h. Similar results were shown by sperm diluted in Extender D. On the contrary, cells diluted in both Extenders A and B had a much slighter increase in the percentage of altered acrosomes, which only reached values of about 30% after 168 h of storage (Fig. 1B). Cells stored in Extender C showed a less important increase of altered acrosomes than that observed in BTS and Extender D, although it was far greater than that of Extenders A and B (Fig. 1B).

3.2. Time-dependent evolution of the values of the Osmotic Resistance Test and Hyperosmotic Resistance Test of stored boar spermatozoa.

In a similar manner to that described for the percentage of viability, stored boar spermatozoa also showed a progressive, time-dependent decline in their values of ORT after dilution in BTS. Thus, these values went from $80.1\%\pm 4.7\%$ in fresh samples to $17.8\%\pm 2.5\%$ after 168 h of storage at 15-17°C (Fig. 2A)

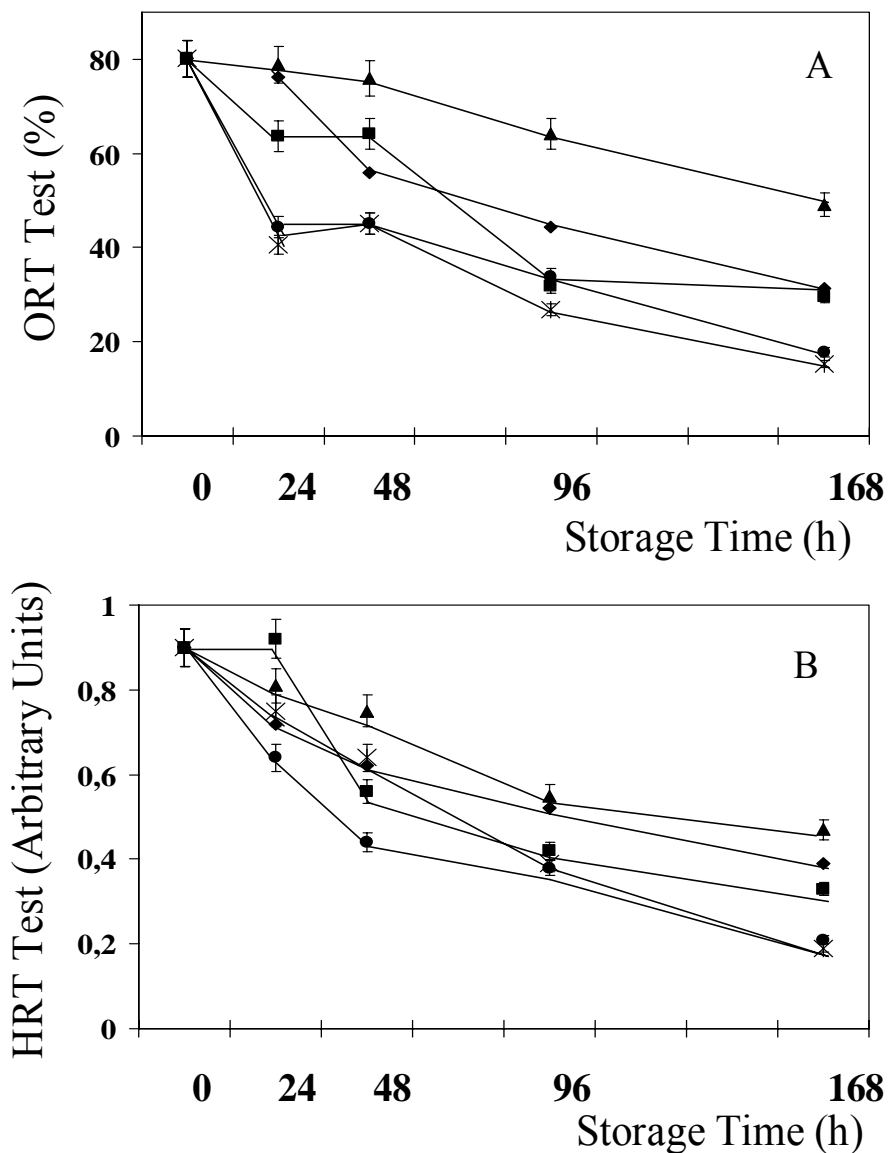


Figure 2. Effects of storage at 16°C-17°C in different media on the results of the ORT and HRT Tests. Boar sperm were diluted in the BTS extender (●) or in the separate experimental A (■), B (▲), C (◆) and D (X) media, during the indicated times. Composition of separate media has been described in the Materials and Methods section. At the indicated times, the values of the ORT Test (A) and the HRT Test (B) were determined in each point. Results are the means ± S.E.M. of 8 separate experiments.

Similar results were determined in spermatozoa diluted in Extender D, whereas those stored in both Extenders A and C showed a less important decline, which reached values of about 30% after 168 h (Fig. 2A). The best response to ORT was observed in

spermatozoa diluted in Extender B, which had a much slighter decrease, with values of $49.2\% \pm 3.2\%$ after 168 h of storage (Fig. 2B).

The results observed in ORT were again concomitant to those determined by HRT. Thus, boar sperm stored in both BTS and Extender D showed a similar decline in HRT values, which went from about 0.90 ± 0.02 in fresh samples to about 0.20 after 168 h (Fig. 2B). On the other hand, the diluent that yielded the least important decline in HRT was, again, Extender B, which reached values in this test of 0.47 ± 0.02 after 168 h of storage (Fig. 2B) Both EA and C showed a decline of HRT that was steeper than that of Extender B, but less than those of both BTS and Extender D (Fig. 2B).

3.3. Time-dependent evolution of the rhythm of L-lactate production of stored boar spermatozoa.

As other parameters, boar sperm diluted in BTS also showed a progressive, time-dependent decline on its values of L-lactate production, which fell from 9.1 ± 1.6 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein in fresh samples to 5.1 ± 0.4 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein after 168 h (Fig. 3).

A similar, progressive decline of this parameter was determined in cells diluted in Extenders A, C and D, and values of Extender D were even lower after 168 h than that of BTS (Fig. 3). Notwithstanding, sperm diluted in Extender B showed a different evolution. Thus, there was an increase in L-lactate formation in these spermatozoa after 24 h-48 h of incubation, with values reaching 12.2 ± 2.5 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein after 48 h (Fig. 3). After this, there was also a decrease on L-lactate formation values, although those evaluated after 168 h of storage were much greater than those of the other extenders (Fig. 3).

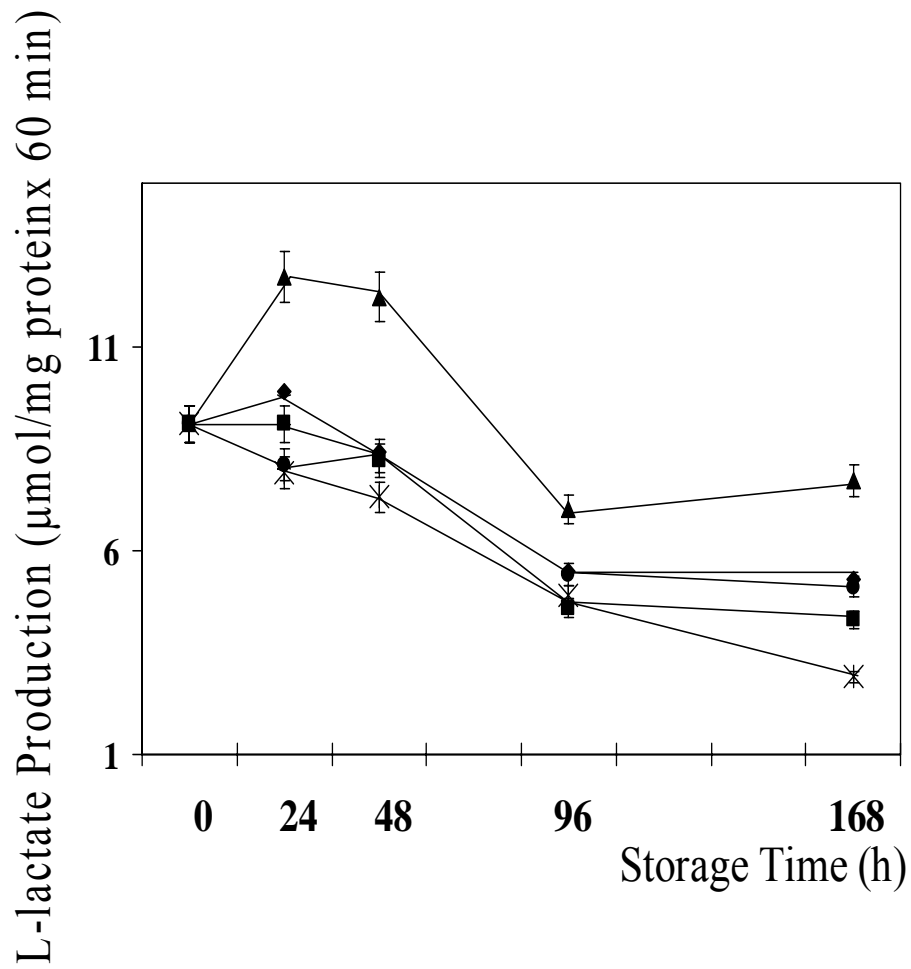


Figure 3. Effects of storage at 16°C-17°C in different media on the results of the rhythm of L-lactate production. Boar sperm were diluted in the BTS extender (●) or in the separate experimental A (■), B (●), C (◆) and D (X) media, during the indicated times. Composition of separate media has been described in the Materials and Methods section. At the indicated times, the rhythm of L-lactate production was determined in each point. Results are the means \pm S.E.M. of 8 separate experiments.

3. DISCUSSION

Our results clearly show that the exact composition, more than the pure quantity of energy substrates, is a very important modulatory factor which affects survival ability of boar sperm in refrigeration. This is clearly stated by the fact that extenders that include an overall final concentration of energy substrates show very different survival abilities, despite this similarity. Even BTS, with a concentration of one single energy substrate far greater than that of the experimental extenders showed a survival ability that was not by any means better. This latter event could be related to the fact that the maximal energy flux is generally achieved by mammalian sperm at relatively low concentrations of substrates. Thus, dog spermatozoa achieve their maximal energy flux rates at both glucose and fructose concentrations as low as 5-10 mM (Rigau et al., 2002), which were much lower than sugar concentrations usually utilized in commercial extenders. A similar result has been observed in boar sperm incubated with glucose (Medrano et al., 2004), thus indicating that this property is probably general in mammals. This implies that, assuming an optimal energy flux rate, the maintenance of the optimal, internal energy levels of boar sperm would depend more on the type than on the total quantity of external energy substrates.

In our experimental design, the medium that yielded the best results concerning boar-semen quality was that which contained relatively high levels of glucose and concomitantly low levels of lactate. As indicated above, it is important to highlight that the effect of this medium was better than that of BTS, with contains only glucose, although at a far higher concentration. This result seems to indicate that an adequate combination of energy substrates could render better conservation effects than the addition of a single substrate in an extender, regardless of the type and concentration of this signal substrate. On the other hand, it is noteworthy that the other combinations,

specially those with lower concentrations of glucose, were much less effective. We can only speculate about the mechanism/s underlying these differences. However, a possible explanation could be the different pathways by which boar sperm obtains energy from both glucose and lactate. Thus, glucose metabolism is mostly performed through glycolysis, whereas a further utilization of glucose metabolites through other ways like the Krebs cycle is very reduced in boar sperm from fresh ejaculates (Marín et al., 2003). On the contrary, the Krebs cycle seems to be the most important way to metabolize lactate in boar sperm (Jones, 1997), and, obviously, this substrate cannot be utilized through glycolysis, since boar sperm lacks the machinery necessary to start up the gluconeogenic pathway (Marín et al., 2003). The presence of two energy substrates which are utilized in different ways would imply that boar sperm would modulate the rhythms of the separate metabolic pathways involved in the utilization of these substrates, and, in this manner, sperm cells will optimize their energy obtainment rate through the simultaneous regulation of these separate pathways. In this sense, it must be remembered that the key regulatory pathways of glycolysis in boar sperm seem to be centered on the hexose uptake and the pyruvate kinase activity pathways (Medrano et al., 2004), whereas lactate dehydrogenase (LDH) activity seems to be primordial in the regulation of the Krebs cycle (Medrano et al., 2003). It is noteworthy that the control of both sperm pyruvate kinase and LDH is greatly dependent on the intracellular ATP/ADP ratio (Medrano et al., 2003; Medrano et al., 2004). This seems to indicate that one of the most important mechanisms by which boar sperm can simultaneously control separate metabolic pathways is through the regulation of its intracellular ATP levels and ATP/ADP ratio, which directly modulates the consumption of very separate energy substrates.

In conclusion, our results indicate that energy efficiency of boar sperm can be increased by an exact combination of monosaccharide and non-monosaccharide energy substrates. This optimization would contribute to a concomitant increase in the survival ability of boar sperm in refrigerated conditions. Thus, the exact combination of several energy substrates that would be utilized through separate metabolic pathways would have to be taken into account when optimizing the design of commercial extenders to store boar spermatozoa at 15°C-17°C.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Mr. Chuck Simmons for his valuable assistance in preparing the English version of the manuscript. This work has been financed by Grant AGL2001-2568 from the “Ministerio de Ciencia y Tecnología” (Spain).

6. REFERENCES

- Bamba K, 1988: Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microcopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology* 29 1245-1251.
- Calvin J, Tubbs PK, 1978: Mitochondrial transport processes and oxidation of NADH by hypotonically –treated boar spermatozoa. *Eur. J. Biochem.* 89 315-320.
- Gadea J, 2003: Semen extenders used in artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research* 1 17-27.
- Jones AR, Chantrill LA, Cokinakis A, 1992: Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 94 129-134.
- Jones AR, 1997: Metabolism of lactate by mature boar spermatozoa. *Reprod. Fertil. Develop.* 9 227-232.

Marín S, Chiang K, Bassilian S, Lee W-N P, Boros LG, Fernández-Novell JM, Centelles JJ, Medrano A, Rodríguez-Gil JE, Cascante M, 2003: Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Let.* 554 342-346.

Medrano A, Peña A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE, 2003: Citrate and lactate as feasible energy sources for boar spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 38 340.

Medrano A, Peña A, Rivera del Alamo M, Ramió L, Rigau T, Rodríguez-Gil J.E., 2004: Utilization of different monosaccharides by boar sperm. *Reprod. Dom. Anim.* 39 259.

Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE, 2004: Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology* 61 673-690.

Rigau T, Piedrafita J, Reverter A, Canal M, Rodríguez-Gil JE, 1996: The rate of L-lactate production: a feasible parameter for the fresh diluted boar semen quality analysis. *An. Reprod. Sci.* 43 161-172.

Rigau T, Rivera M, Palomo MJ, Fernández-Novell JM, Mogas T, Ballester J, Peña A, Otaegui PJ, Guinovart JJ, Rodríguez-Gil JE, 2002: Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. *Reproduction* 123 579-591.

Rodríguez-Gil JE, Rigau T, 1995: Effects of slight agitation on the quality of refrigerated boar sperm. *An. Reprod. Sci.* 39 141-146.

SAS. SAS/STAC Software. Cary, NC: SAS Inst. Inc.; 1996.

CAPÍTULO V
TEXTO EN ESPAÑOL

**LAS VARIACIONES EN LA PROPORCIÓN DE SUSTRATOS ENERGÉTICOS
GLUCOLÍTICOS/NO GLUCOLÍTICOS MODULAN LA CALIDAD ESPERMÁTICA
EN MUESTRAS DE CERDO ALMACENADAS A 16°C-17°C.**

A. Medrano, A. Peña, T. Rigau y J.E. Rodríguez-Gil*

Unidad de Reproducción Animal. Depto. De Medicina y Cirugía Animal. Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. E-08193 Bellaterra España.

*A quien se debe dirigir la correspondencia.

Dirección de correspondencia: Joan E. Rodríguez-Gil. Unidad de Reproducción Animal. Depto. de Medicina y Cirugía Animal. Escuela de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. E-08193 Bellaterra. España.

Teléfono: 34-935811045

Fax: 34-935812006

E-mail: juanenrique.rodriguez@uab.es

Palabras clave: Semen de cerdo, Conservación refrigerada, Glucolisables/no glucolisables. Sustratos energéticos

Reproduction in Domestic Animal; In press (2005)

RESUMEN.

Este trabajo analiza el papel de los sustratos energéticos en el mantenimiento de la supervivencia de los espermatozoides de cerdo durante su conservación a 15-17°C. Para este propósito, se conservaron espermatozoides de cerdo a temperatura de 15-17°C en algunos medios definidos que contenían combinaciones diferentes de un monosacárido, la glucosa, con algún sustrato energético no metabolizable a través de glucólisis, el citrato o el lactato, como sustrato energético. Nuestros resultados indican que el medio que contenía la más alta concentración de glucosa empleada en combinación con bajos niveles de lactato era el más indicado para mantener la calidad espermática hasta las 168 h de conservación. Esta conclusión se dedujo a partir de los resultados observados en parámetros de calidad seminal como los porcentajes de viabilidad y acrosomas alterados, la prueba de resistencia osmótica (ORT), la prueba de resistencia hiperosmótica (HRT), y el ritmo de formación de L-lactato. Hay que destacar que la capacidad de supervivencia de los espermatozoides de cerdo era mayor en este medio experimental que en un medio de Beltsville estándar (BTS), que contiene sólo glucosa como sustrato de energía aunque a una concentración mucho más alta que la utilizada en cualquiera de los medios experimentales analizados. Por lo tanto, nuestros resultados indican que la composición exacta, más que la cantidad de sustratos energéticos en sí, es un importante factor modulador de la capacidad de supervivencia del esperma de cerdo refrigerado. Así, la combinación exacta de varios sustratos energéticos tendría que ser tomada en cuenta al optimizar el diseño de los diluyentes comerciales de conservación de espermatozoides de cerdo a 15-17°C.

1. INTRODUCCIÓN.

La inseminación artificial (IA) es uno de los factores más importantes subyacentes a la gran expansión de la porcicultura que se ha producido en los últimos años en los países occidentales. La utilización masiva de la inseminación artificial en las granjas de cerdo es consecuencia del desarrollo de técnicas eficaces para conservar el semen de cerdo durante un tiempo lo bastante largo como para hacer esta técnica práctica desde el punto de vista económico. Así, en los últimos años el desarrollo de una amplia gama de diluyentes comerciales ha permitido optimizar la conservación de semen de cerdo a temperatura de entre 15-17°C, satisfaciendo así las necesidades económicas de los productores (ver 1). La base general de todos los diluyentes comerciales consta de una serie de requisitos mínimos necesarios para mantener la supervivencia óptima de los espermatozoides de cerdo. De entre estos requerimientos, uno de los más importantes es la presencia de una fuente de energía fácilmente utilizable, que permita el mantenimiento de las funciones espermáticas básicas durante el tiempo necesario. Actualmente el sustrato mas utilizado como fuente de energía en los diluyentes de refrigeración es la glucosa, que se añade a concentraciones finales muy altas en el diluyente, entre 100mM y 200mM (ver 1 para algunos ejemplos). Este rango de concentraciones es muy superior al considerado como fisiológico en las células eucarióticas (que esta en el rango de entre 10mM y 20mM, ver 2). Además, los diluyentes comerciales suelen incorporar otras sustancias que pueden ser utilizadas por los espermatozoides de cerdo como fuente de energía. La más utilizada de éstas es el citrato, el cual es utilizado como uno de los componentes necesarios en el mantenimiento de la osmolaridad y el pH (1), si bien el espermatozoide de cerdo es capaz de consumirlo a través del ciclo de Krebs (3), de hecho, todos estos datos indican claramente que, en los diluyentes actuales, la adición de una fuente de energía concreta

a una concentración específica se basa en un conocimiento empírico que dificulta la total optimización de dichos diluyentes. Dicha optimización podría llevarse a cabo mediante un uso más racionalizado de las fuentes de energía agregadas a la solución.

Los espermatozoides de cerdo tienen un sistema complejo de optimización de sus niveles de energía, el cual se regula mediante un sofisticado equilibrio en los flujos de energía. En concreto, espermatozoides procedentes de eyaculados frescos muestran una gran tendencia hacia el consumo de monosacáridos a través del flujo glucolítico, puesto que menos del 1% de la energía obtenida de la glucosa en estas condiciones proviene del ciclo de Krebs (4). Sin embargo, las células espermáticas de cerdo también muestran diferencias notables en su habilidad de consumir diferentes azúcares, y, de esta manera, la glucosa es el monosacárido más fácilmente consumido a través de la glucólisis comparado con otros como la fructosa, el sorbitol o la manosa (5). Estas diferencias están estrechamente relacionadas con la capacidad del espermatozoide de fosforilar estos azúcares. De esta manera, en el espermatozoide de cerdo la actividad hexoquinasa total es más eficaz fosforilando glucosa, que fructosa o manosa, introduciendo de esta manera más rápidamente la glucosa a través de la glucólisis (5).

No obstante, los espermatozoides de cerdo también pueden utilizar otras sustancias además de las hexosas como sustratos energéticos. Así, el lactato (6), el glicerol (7) y el anteriormente citado citrato (3) pueden ser utilizados por los espermatozoides de cerdo para obtener energía, aunque la energía obtenida de estos sustratos es menor que la obtenida de la glucosa (3,6,7). La utilización de estos sustratos plantea la pregunta acerca de cuál vía metabólica emplea el espermatozoide para su utilización, puesto que la principal vía metabólica de estas células, la glucólisis, no es utilizable en sustratos como el lactato o el citrato. De hecho, el citrato y el lactato son metabolizados directamente a través del ciclo de Krebs (3,6). Por lo tanto, la conversión del ciclo de

Krebs de una vía metabólica marginal en la presencia de azúcares a una vía importante en la presencia de otros sustratos energéticos también abre la pregunta de cómo el espermatozoide de cerdo controla la actividad del ciclo de Krebs para modular estos cambios en los ritmos de flujo energético. Todas estas preguntas resaltan la gran complejidad que envuelve al control de la gestión de la energía en el espermatozoide de cerdo, ya que dicha gestión parece involucrar más de un único mecanismo, relacionado con el control de la velocidad de flujo glucolítico.

Desde un punto de vista práctico, la compleja regulación del metabolismo de la energía en el espermatozoide de cerdo plantea la pregunta sobre la influencia de la concentración y el tipo específico de sustratos energéticos que tienen la capacidad de supervivencia en un diluyente para refrigeración (15-17°C). Esta pregunta es importante, ya que prácticamente todos los diluyentes comerciales que se utilizan en este momento incluyen concentraciones altas de glucosa como sustrato energético, pero también muchos de ellos incluyen citrato, si bien no como sustrato energético, a pesar del hecho de que el espermatozoide de cerdo puede consumirlo.

Hay de hecho en la literatura una falta notable de observaciones sobre cómo la variación en la cantidad y el tipo de sustratos energéticos pueden influir en la supervivencia del semen. Este no es un punto baladí, ya que este conocimiento puede ayudar a perfeccionar los diluyentes para almacenamiento refrigerado, ajustando la concentración y el tipo específico de sustratos energéticos utilizados. Teniendo en cuenta este hecho, el objetivo principal de este trabajo fue estudiar el efecto que tiene la composición específica de sustratos energéticos sobre la capacidad de supervivencia del semen de cerdo conservado a 15-17°C. Para ello se diseñaron 4 tipos diferentes de diluyentes con similares valores de osmolaridad y pH. Todos estos diluyentes experimentales tenían una combinación de glucosa y un sustrato energético no glucolítico, que podía ser

citrato o L-lactato. Las combinaciones glucosa/citrato y glucosa/L-lactato fueron hechas con el objetivo de obtener unos diluyentes con concentraciones altas de glucosa y concentraciones bajas de sustratos no glucolíticos y otros con concentraciones bajas de glucosa y concentraciones altas de citrato o L-lactato. Los espermatozoides de cerdo se mantuvieron en estos medio de refrigeración durante 168 h entre 15-17°C. Además, otra alícuota de semen se diluyó en medio Beltsville Thawing Solución (BTS) básico, específicamente diseñado para conservación de semen de cerdo (8), con la intención de tener un control externo de la supervivencia espermática. La calidad seminal fue determinada mediante la determinación de aquellos parámetros que artículos previos han mostrado como los más válidos en nuestras condiciones de trabajo (9,10). Siguiendo esta información, los parámetros de calidad espermática utilizados en este estudio fueron el porcentaje de viabilidad y cromosomas alterados, la prueba de resistencia osmótica (prueba ORT) y la prueba de resistencia hiperosmótica (prueba HRT), tal y como se publicó en (10), y el ritmo de formación de L-lactato, basándose en los resultados mostrados en (9).

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Recogida y procesado de las muestras seminales.

El semen fue obtenido a partir de seis cerdos sanos y sexualmente maduros provenientes de una granja comercial (Servicios Genéticos Porcinos, S.L.; Roda deTer, España). Los cerdos eran dos Large white, tres Pietrain x Large white y un Pietrain x Blanco Belga, y tenían una edad de 2-3 años. El eyaculado se obtenía manualmente, y la fracción rica en espermatozoides se separaba y se colocaba inmediatamente después en un baño de agua termostaticado a 37°C. En este momento, una alícuota de 1 mL fue tomada para evaluar las características principales de los espermatozoides por medio del análisis de calidad

espermática siguiendo las pautas prácticas descritas en (10). Las características de calidad espermática de la fracción rica de estos eyaculados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Características generales de los eyaculados de cerdo utilizados

Concentración según análisis	795,5 ± 32,7
Con cámara hemocitométrica (10 ⁶ espermatozoides/mL)	
Viabilidad (%)	87,3 ± 2,7
Acrosomas Alterados (%)	7,9 ± 0,3
ORT (%)	81,5 ± 3,5
HRT (unidades propias)	0,94 ± 0,02
Ritmo de producción de L-lactato (µmol/60 Minutos x mg de proteína)	9,1 ± 1,8
Anormalidades morfológicas totales (%)	9,7 ± 1,2
Anormalidades morfológicas de cabeza (%)	0,3 ± 0,1
Anormalidades de pieza intermedia y cuello (%)	1,5 ± 0,2
Anormalidades de cola (%)	0,9 ± 0,1
Gotas citoplasmáticas proximales (%)	2,9 ± 0,3
Gotas citoplasmáticas distales (%)	4,1 ± 0,5

Los parámetros de calidad seminal fueron descritos en la sección de Materiales y Métodos.

Los resultados muestran las medias ± S.E.M. de 8 eyaculados diferentes.

Después, la fracción rica en espermatozoides se dividió en 5 alícuotas de igual volumen, y cada una de estas alícuotas se diluyó en uno de los medios experimentales diseñados o en BTS a una concentración final 2×10^7 espermatozoides/mL en todos los casos. La composición de todos los diluyentes utilizados se muestra en la tabla 2. Las muestras

diluidas eran envasadas en dosis comerciales de 100 mL destinadas a la IA. Las concentraciones de las muestras se determinaron mediante una cámara hemocitométrica de Neubauer o Thoma a 200x. Las dosis se almacenaron luego a 15-17°C. En los tiempos indicados en el estudio, se extraía una alícuota de 1 mL de cada diluyente para evaluar en ella los parámetros analizados.

Tabla 2. Características de los diluyentes experimentales utilizados

Diluyente	BTS	A	B	C	D
Glucosa (g/L)	37,00	18,00	27,02	18,00	18,00
KCl (g/L)	0,75	1,48	1,48	0,74	0,74
NaHCO ₃ (g/L)	1,25	-----	-----	-----	-----
Lactato de sodio (g/L)	-----	-----	2,80	-----	13,44
Citrato de sodio (g/L)	6,00	5,90	-----	23,52	-----
Tris Base Tampón (g/L)	-----	7,90	6,04	6,04	6,04
Ácido Etilen Diamino Acético (g/L)	1,25	1,24	1,24	1,24	1,24
pH	7,2	7,4	7,4	7,4	7,4
Osmolaridad (mOsm)	330	328	317	318	31

2.2. Procedimientos analíticos.

Los porcentajes de viabilidad, acrosomas alterados, y anomalías morfológicas en eyaculados frescos se determinaron utilizando la tinción de eosina-nigrosina (11). Estos porcentajes se cuantificaban tras contar 200-300 espermatozoides por cada muestra al microscopio óptico a 1000x aumentos. Se consideraban como acrosomas alterados aquellos que no mostraron un borde acrosomal uniforme y nítido. Las anomalías morfológicas fueron clasificadas de acuerdo con su localización en anomalías de cabeza, cuello y pieza intermedia, y anomalías de la cola. Por otra parte, las gotas citoplasmáticas proximales y distales se contaron como entidades separadas.

La prueba ORT se realizó tal y como fue descrita por Rodríguez-Gil y Rigau (12). Asimismo, la prueba HRT se llevó a cabo tal y como fue descrita en (10). De acuerdo con esta descripción, la prueba HRT se basó en la relación existente entre el porcentaje de viabilidad observado en una muestra colocada en un medio hiperosmótico y el porcentaje de viabilidad en la misma muestra sometida a un cambio brusco de osmolaridad desde un medio hiperosmótico a otro isosmótico. Esta relación se expresó mediante la fórmula:

$$\text{HRT} = \text{VD}/\text{VU}$$

En donde VD es el porcentaje de viabilidad en el medio isosmótico final y VU es el porcentaje de viabilidad en el medio hiperosmótico inicial. Finalmente, el ritmo de producción de L-lactato se determinó siguiendo el procedimiento descrito en (9).

2.3. Análisis estadísticos.

Todos los datos recogidos fueron analizados por medio del paquete estadístico SAS/STAT (13). Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado para determinar la posible diferencia significativa entre grupos en todos los parámetros estudiados.

3. RESULTADOS.

3.1. Evolución dependiente del tiempo de los porcentajes de viabilidad y de acrosomas alterados en espermatozoides de cerdo conservados en diferentes diluyentes.

Los espermatozoides de cerdo conservados en un medio BTS mostraron un declive progresivo en el porcentaje de viabilidad, que dependía del tiempo de conservación. Esta disminución iba desde el $87,0 \pm 5,3\%$ al inicio de la conservación hasta el $66,3 \pm 4,7\%$ a las 168 horas (Fig.1A). Por otro lado, los diluyentes experimentales probados mostraron diferentes efectos sobre este parámetro. Así, mientras los espermatozoides de cerdo conservados en el diluyente D sufrían una disminución muy marcada en su viabilidad, la cual alcanzo $50,8 \pm 4,0\%$ luego de 168 horas (Fig. 1A), los diluyentes B y C mostraron una mayor capacidad que el BTS para el mantenimiento de la viabilidad. De hecho, el diluyente B mostró una gran capacidad, de tal manera que no se observó un descenso significativo de este parámetro tras 168 horas de conservación, respecto a los valores de las muestras frescas (Fig. 1A).

Al mismo tiempo, también se observó un efecto dependiente del tiempo sobre el porcentaje de acrosomas alterados. Así, tal y como se observa en la Fig. 1B, los espermatozoides conservados a 16-17°C en BTS sufrieron un progresivo incremento en este porcentaje, que paso de $6,2 \pm 1,4\%$ en muestras frescas a $74,6 \pm 5,0\%$ tras 168 horas. Resultados similares se observaron en espermatozoides diluidos en el medio D. Por el contrario, las células diluidas en los medios A y B tuvieron sólo un ligero incremento en el porcentaje de acrosomas alterados, alcanzando valores aproximados del 30% después de 168 horas de conservación (Fig. 1B). Finalmente, las células conservadas en el medio C mostraron un aumento menor en el porcentaje de acrosomas alterados que el observado en BTS y medio D, si bien este aumento era mucho mayor que el detectado en los medios A y B (Fig.1B).

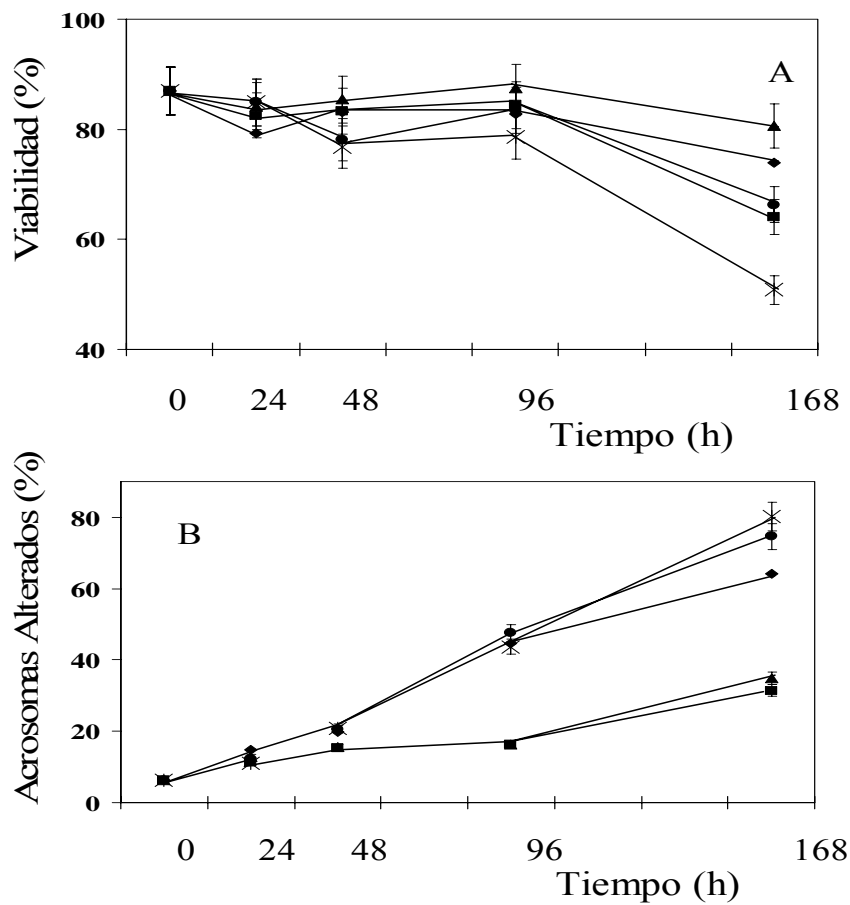


Figura 1. Efecto del almacenamiento a 16°C-17°C en diferentes medios sobre los Porcentajes de viabilidad y acrosomas alterados en espermatozoides de cerdo. Los espermatozoides de cerdo fueron diluidos en el diluyente BTS (λ) y en cuatro diferentes medios experimentales A (ν), B (σ), C (ν) y D(X), durante los tiempos indicados. La composición de los diferentes medios fue descrita en la sección Materiales y Métodos. A los tiempos indicados, los porcentajes de viabilidad (A) y acrosomas alterados (B) fueron determinados. Los resultados fueron la media \pm S.E.M. de 8 experimentos diferentes.

3.2. Evolución dependiente del tiempo de los resultados obtenidos en las pruebas de Resistencia Osmótica y Resistencia Hiperosmótica en espermatozoides de cerdo conservados en diferentes diluyentes.

Los espermatozoides de cerdo conservados también mostraron un declive progresivo, dependiente del tiempo, en sus valores de ORT después de su dilución en BTS de una manera similar a lo descrito para el porcentaje de viabilidad. Así, estos valores fueron del $80,1 \pm 4,7\%$ en muestras frescas hasta el $17,8 \pm 2,5\%$ tras 168 horas de conservación a $15-17^\circ\text{C}$ (Fig. 2A). Resultados similares se observaron en los espermatozoides diluidos en el medio D, mientras que aquellos conservados en los medios A y C mostraron un declive menor, alcanzando valores de aproximadamente el 30% tras 168 horas (Fig. 2A). La mejor respuesta a la prueba ORT se observó en los espermatozoides diluidos en el medio B, los cuales tenían una disminución muy ligera, alcanzando valores del $49,2 \pm 3,2\%$ tras 168 horas de conservación (Fig. 2B).

Los resultados observados en la prueba ORT fueron concordantes con los determinados por la prueba HRT. Así, los espermatozoides de cerdo conservados en BTS y medio D mostraron un declive similar en HRT, con valores que eran aproximadamente de $0,90 \pm 0,02$ en muestras frescas y de aproximadamente 0,20 tras 168 horas (Fig. 2B). Por otro lado, el diluyente que mostró el menor declive en HRT fue de nuevo el diluyente B, que alcanzó valores en esta prueba de $0,47 \pm 0,02$ tras la conservación durante 168 horas (Fig. 2B). Los medios A y C mostraron un declive de HRT más intenso que el medio B, pero menos que el de los espermatozoides conservados en BTS o medio D (Fig. 2B).

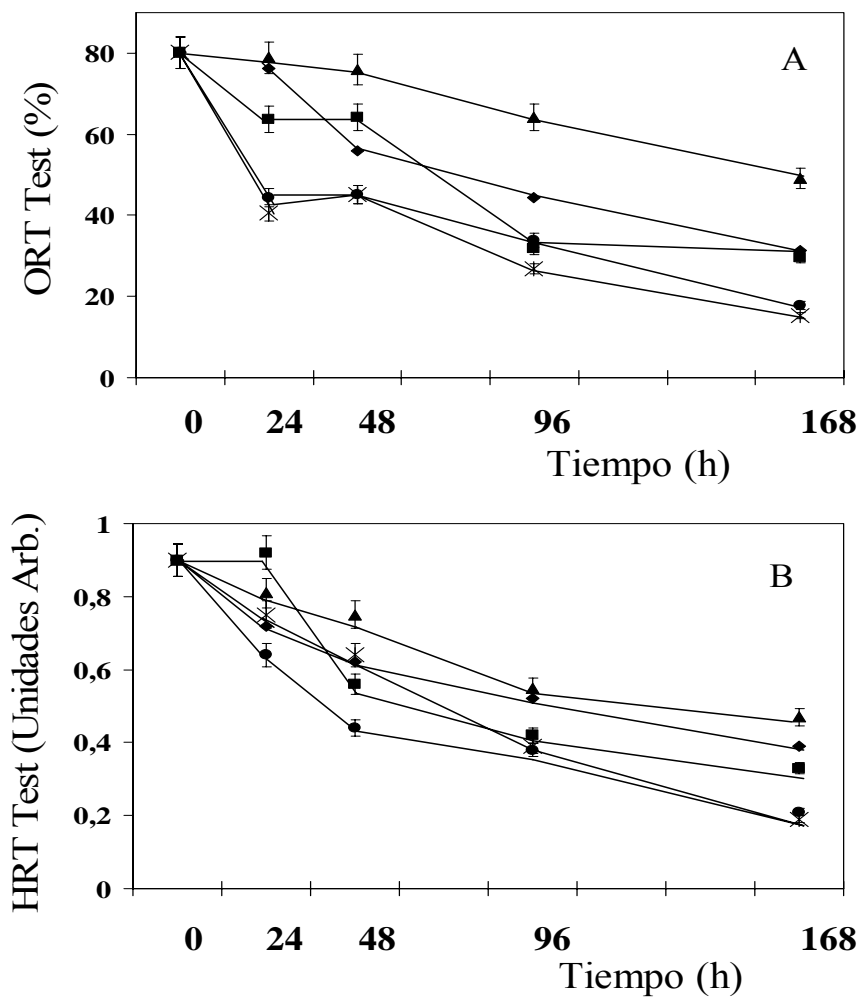


Figura 2. Efecto del almacenamiento a 16°C-17°C en diferentes medios sobre los resultados de las pruebas de ORT y HRT. Los espermatozoides de cerdo fueron diluidos en el diluyente BTS (λ), y en cuatro medios experimentales A (v), B (σ), C (v) D(X) durante los tiempos indicados. La composición de los diferentes medios ha sido descritos en la sección Materiales y Métodos. A los tiempos indicados, los valores de las pruebas de ORT (A) y HRT (B) fueron determinados en cada punto. Los resultados fueron la media \pm S.E.M. de 8 diferentes experimentos.

3.3. Evolución dependiente del tiempo del ritmo de producción de L-lactato de los espermatozoides de cerdo conservados en distintos diluyentes.

Como en parámetros anteriores, los espermatozoides de cerdo diluidos en BTS mostraron un declive progresivo, dependiente del tiempo, de los valores de producción de L-lactato que pasó de $9,1 \pm 1,6$ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína en eyaculados frescos hasta $5,1 \pm 0,4$ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína tras 168 horas de conservación (Fig. 3). Un declive similar en este parámetro fue determinado en células diluidas en los medios A, C y D, e incluso los valores en el medio D fueron más bajos que los observados con BTS (Fig. 2B). No obstante, los espermatozoides diluidos en medio B mostraron una evolución diferente. Se apreció un aumento en la formación de L-lactato en estos espermatozoides durante las primeras 24-48 horas de incubación, con valores que alcanzaron $12,2 \pm 0,9$ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína tras 48 horas (Fig. 3). Con posterioridad a este incremento, se observó un descenso en los valores de formación de L-lactato, si bien la evaluación a las 168 horas de conservación mostró que los valores de formación de L-lactato estas condiciones eran muy superiores a los observados en los otros medios (Fig. 3).

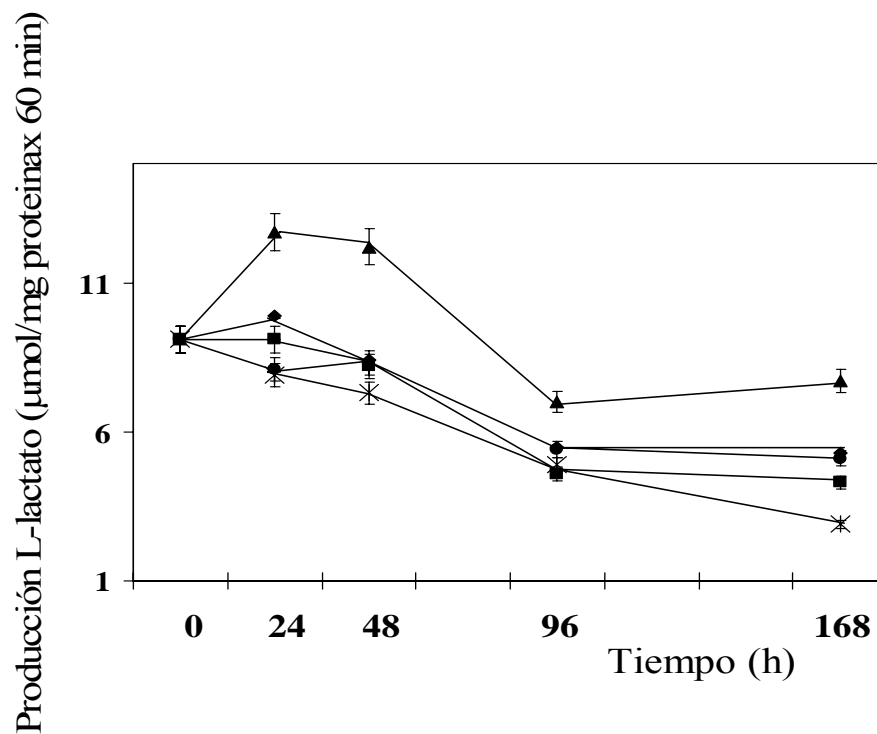


Figura 3. Efecto del almacenamiento a 16°C-17°C en diferentes medios sobre el ritmo de producción de L-lactato resultante. Espermatozoides de cerdo fueron diluidos en diluyente BTS (λ), y en los diferentes medios experimentales A (ν), B (σ), C (ν) D (X), durante los tiempos indicados. La composición de los diferentes medios fue descrita en la sección Materiales y Métodos. A los tiempos indicados, El ritmo de producción de L-lactato fue determinado en cada punto. Los resultados fueron la media \pm S.E.M. de 8 diferentes experimentos.

4. DISCUSIÓN.

Nuestros resultados muestran claramente que la composición exacta, más que la pura cantidad de sustratos de energía, es un factor modulador muy importante que afecta la capacidad de supervivencia de los espermatozoides de cerdo en refrigeración. Esta aseveración se demuestra con claridad por el hecho de que diluyentes que incluyen una concentración final global de sustratos energéticos parecida muestran, en cambio, capacidades de supervivencia muy diferentes, a pesar del parecido nivel en reservas energéticas. Incluso el BTS, con una concentración mucho mayor de un solo sustrato energético que los diluyentes experimentales, mostró una capacidad de supervivencia que no fue significativamente mejor. Este resultado podría relacionarse con el hecho de que el flujo de energía máximo generalmente es logrado a concentraciones relativamente bajas de sustratos energéticos en espermatozoides de mamíferos. Así, los espermatozoides de perro alcanzan su flujo energético máximo a concentraciones de glucosa y fructosa tan bajas como 5-10 mM (14), que son mucho más bajas que las concentraciones de azúcares normalmente utilizados en los diluyentes comerciales. Un resultado similar se ha observado en espermatozoides de cerdo incubado con glucosa (5), indicando así que esta propiedad es probablemente general en mamíferos. Por lo tanto, si se asume un ritmo óptimo de flujo de energía, el mantenimiento del nivel de energía interna adecuado de los espermatozoides de cerdo dependerá más del tipo que de la cantidad total de sustratos energéticos a su disposición.

En nuestro diseño experimental, el diluyente que produjo mejores resultados fue el que tenía niveles relativamente altos de glucosa asociados a niveles bajos de lactato. Teniendo en cuenta la exposición arriba justificada, hay que resaltar el hecho de que efecto conservador de este medio era mejor que el del BTS que contiene sólo glucosa, aunque a una concentración mucho más alta. Este resultado es un nuevo indicador de

que una combinación adecuada de sustratos energéticos podría provocar un mejor efecto en la conservación que la adición de un solo sustrato energético en un diluyente, indiferentemente del tipo y concentración de este único sustrato. Por otro lado, hay que destacar que las otras combinaciones, especialmente aquellas con concentraciones bajas de glucosa, eran mucho menos eficaces. En este momento sólo podemos especular sobre los mecanismos que están detrás de estas diferencias. Sin embargo, una posible explicación podría ser las diferentes vías metabólicas por las que el espermatozoide de cerdo obtiene su energía a partir de glucosa y de lactato. Así, el metabolismo de la glucosa es principalmente realizado a través de la glucólisis, considerando que la utilización de otras vías metabólicas como el ciclo de Krebs se encuentra muy reducida en el espermatozoide de cerdo en eyaculados frescos (4). Al contrario, el ciclo de Krebs parece ser la vía más importante para el metabolismo del lactato en el espermatozoide de cerdo (6) y, obviamente, este sustrato no puede ser utilizado por la vía glucolítica, ya que el espermatozoide de cerdo carece de los mecanismos necesarios para poner en marcha la gluconeogénesis (4). La presencia de dos sustratos energéticos que son utilizados de manera diferente implicaría que el espermatozoide de cerdo debe modular los ritmos de las vías metabólicas involucradas en la utilización de estos sustratos. De esta manera, las células espermáticas optimizan su obtención de energía a través de la modulación de estas dos vías metabólicas. En este sentido, hay que recordar que los puntos de control de la vía glucolítica en los espermatozoides de cerdo son principalmente la captación de hexosas y la actividad piruvato quinasa (5), mientras que la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) es el principal punto de regulación del ciclo de Krebs (15). Hay que destacar que el control de las actividades piruvato quinasa y LDH es muy dependiente de la relación entre los niveles intracelulares de ADP y de ATP (5,15). Todo ello parece indicar que uno de los principales mecanismos en el

control simultáneo por parte del espermatozoide de cerdo de la glucólisis y el ciclo de Krebs se lleva a cabo a través del control de los niveles intracelulares de ATP y de la relación ADP/ATP, las cuales modulan de forma directa el consumo de los diferentes sustratos energéticos.

En conclusión, nuestros resultados indican que la eficiencia energética de los espermatozoides de cerdo puede ser optimizada mediante la combinación correcta de un monosacárido y un sustrato energético no monosacárido. Esta optimización contribuiría a un aumento en la capacidad de supervivencia de los espermatozoides de cerdo en condiciones de refrigeración. Así, la combinación exacta de varios sustratos energéticos que son utilizados a través de vías metabólicas diferentes debería ser tomada en cuenta a la hora de perfeccionar la composición exacta de los diluyentes comerciales utilizados en la conservación de espermatozoides de cerdos refrigerados a 15-17°C.

5. AGRADECIMIENTOS.

Nosotros agradecemos al Sr. Chuck Simmons por su valiosa asistencia en la preparación de la versión Inglesa de este manuscrito. Este trabajo fue financiado a través de la concesión AGL-2001-2568 del “Ministerio de Ciencias y Tecnología” (España).

6. REFERENCIAS

Bamba K, 1988: Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology* 29 1245-1251.

Calvin J, Tubbs PK, 1978: Mitochondrial transport processes and oxidation of NADH by hypotonically –treated boar spermatozoa. *Eur. J. Biochem.* 89 315-320.

Gadea J, 2003: Semen extenders used in artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research* 1 17-27.

- Jones AR, Chantrill LA, Cokinakis A, 1992: Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* *94* 129-134.
- Jones AR, 1997: Metabolism of lactate by mature boar spermatozoa. *Reprod. Fertil. Develop.* *9* 227-232.
- Marín S, Chiang K, Bassilian S, Lee W-N P, Boros LG, Fernández-Novell JM, Centelles JJ, Medrano A, Rodríguez-Gil JE, Cascante M, 2003: Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Let.* *554* 342-346.
- Medrano A, Peña A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE, 2003: Citrate and lactate as feasible energy sources for boar spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* *38* 340.
- Medrano A, Peña A, Rivera del Alamo M, Ramió L, Rigau T, Rodríguez-Gil J.E., 2004: Utilization of different monosaccharides by boar sperm. *Reprod. Dom. Anim.* *39* 259.
- Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE, 2004: Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology* *61* 673-690.
- Rigau T, Piedrafita J, Reverter A, Canal M, Rodríguez-Gil JE, 1996: The rate of L-lactate production: a feasible parameter for the fresh diluted boar semen quality analysis. *An. Reprod. Sci.* *43* 161-172.
- Rigau T, Rivera M, Palomo MJ, Fernández-Novell JM, Mogas T, Ballester J, Peña A, Otaegui PJ, Guinovart JJ, Rodríguez-Gil JE, 2002: Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. *Reproduction* *123* 579-591.
- Rodríguez-Gil JE, Rigau T, 1995: Effects of slight agitation on the quality of refrigerated boar sperm. *An. Reprod. Sci.* *39* 141-146.
- SAS. SAS/STAC Software. Cary, NC: SAS Inst. Inc.; 1996.

CAPÍTULO VI:

DISCUSIÓN GENERAL DE RESULTADOS

Los espermatozoides una vez que son eyaculados requieren de una producción permanente de ATP tanto para el mantenimiento de las estructuras celulares como para la motilidad y la composición de iones intracelulares. Para cumplir este requerimiento los espermatozoides maduros de cerdo pueden utilizar varios sustratos intracelulares y extracelulares (Kamp et al., 2003; Jones and Buba 2000).

El primer capítulo experimental de esta tesis doctoral se basó en el estudio de la habilidad que presentan los espermatozoides de cerdo provenientes de eyaculados frescos para la utilización de distintos sustratos extracelulares en la satisfacción de sus requerimientos energéticos (Jones et al., 1992; Jones, 1997; Jones and Connor., 2000; Marín et al., 2003). Sin embargo, los monosacáridos constituyen la principal fuente de energía para el espermatozoide de cerdo y la principal forma de utilización de estos azúcares es su metabolización por la vía de la glucólisis.

En algunas especies, estos azúcares son utilizados con la misma eficiencia. Sin embargo en otras especies, el metabolismo de sustratos exógenos puede servir para funciones celulares específicas. La energía obtenida a través de otras vías de metabolización de la glucosa (Ciclo de Krebs) y la fructosa (Jones and Connor ., 2000) sólo es el 5% del total de la energía producida por el azúcar (Marín et al., 2003).

El metabolismo de las hexosas juega un papel importante en la modulación de la generación de energía para el funcionamiento y la supervivencia de los espermatozoides. La glucólisis tiene un rol importante en el suministro de ATP destinado al movimiento de los espermatozoides (Mukai and Okuno., 2004) a pesar de la creencia tradicionalmente aceptada acerca de que el ciclo de Krebs y la actividad mitocondrial (y no la glucólisis) son los que mantienen la motilidad espermática.

Los espermatozoides constituyen un buen ejemplo para el estudio de aspectos básicos del control metabólico y el papel del ATP en las diferentes funciones celulares, tales como: el mecanismo de la depresión metabólica durante la conservación de la célula, los canales metabólicos en el citoplasma y la organización y regulación de enzimas glucolíticas; ya que en primer lugar, estas células pasan por distintos estados metabólicos desde la espermiogénesis hasta ser eyaculados. En segundo lugar, por la polaridad de los espermatozoides, en los cuales, las mitocondrias están ubicadas en la pieza principal de la cola y tienen además otro mecanismo de gestión energética que está situado en la cabeza del espermatozoide y es totalmente autónomo del metabolismo energético ligado a las mitocondrias, y por último porque los espermatozoides pueden ser parcialmente demembrados sin que ocurra pérdida de la motilidad (Kamp et al., 1996). Así, la utilización diferencial de cuatro monosacáridos distintos: glucosa, fructosa, y manosa, los cuales entran al metabolismo energético por fosforilación directa (Lehninger et al., 1993) y el sorbitol que entra en la glucólisis a través de una vía indirecta, (Newsholme and Leech., 1983) nos permitieron evidenciar que la capacidad metabólica de dichos espermatozoides varía dependiendo del monosacárido utilizado como fuente de energía.

Nuestros resultados muestran claramente que las diferencias observadas, en la utilización de estos monosacáridos a través de la glucólisis por los espermatozoides de cerdo, tienen su base primaria en sus diferentes ritmos de fosforilación por la maquinaria celular. De los azúcares utilizados en este estudio, la glucosa presentó la mayor lactogenicidad y por tanto es la más eficientemente utilizada, en cambio el sorbitol, indujo un ritmo lactogénico bajo, lo cual podría deberse al hecho de ser el único de estos monosacáridos que es utilizado a través de una vía indirecta muy complicada.

En relación a la utilización de la fructosa, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Jones y Connor (2000), con respecto a que los espermatozoides de cerdo utilizan la fructosa con menor eficiencia que la glucosa. Esto es debido a dos factores: 1) la baja sensibilidad de la fructosa a la hexoquinasa cuando la comparamos con la glucosa, y 2) la falta de una vía alternativa para entrar a la glucólisis, catalizada por una enzima fructoquinasa específica. Esta actividad fructoquinasa se caracteriza por fosforilar la fructosa a fructosa 1-fosfato en lugar de glucosa 6-fosfato. Estudios llevados a cabo por nuestro laboratorio indican que los espermatozoides de cerdo tienen niveles insignificantes de actividad fructoquinasa (resultados no publicados) y de esta manera, la única vía para la utilización de la fructosa a través de la glucólisis es pasando por la fosforilación mediada por hexoquinasa.

En resumen, la glucosa es fosforilada mucho más rápidamente y en mayor intensidad por la actividad hexoquinasa que los otros tres azúcares utilizados en este estudio, lo que provoca una mejor y más rápida formación de G 6-P que se metaboliza en la glucólisis. Hasta el momento, desconocemos cual es la finalidad de los espermatozoides de cerdo para el desarrollo de esta especialización de los sustratos utilizados, aunque quizás una posible explicación sería el uso, por parte de los espermatozoides de estos azúcares, no sólo como fuente de energía sino también como señalizadores funcionales. El segundo capítulo experimental de esta tesis se centró en la utilización de sustratos exógenos no monosacáridos por parte de los espermatozoides de cerdo para gestionar la satisfacción de sus requerimientos de ATP tras la eyaculación. De nuestros resultados se desprende que los espermatozoides provenientes de eyaculados frescos de cerdo pueden utilizar eficientemente tanto el citrato como el lactato como única fuente de energía, en ausencia de cualquier otro sustrato energético, como se refleja por el incremento de los

niveles intracelulares de ATP inducidos por la utilización de ambos sustratos en el medio de mantenimiento.

Cuando hay sustratos extracelulares para la glucólisis los espermatozoides son capaces de metabolizar esos sustratos por vía glucolítica para proveer energía para el movimiento del flagelo, pero cuando hay poco sustrato para la glucólisis, los espermatozoides pueden metabolizar sustratos respiratorios (Mukai and Okuno., 2004).

Nuestros resultados indican claramente que la metabolización de citrato y lactato mantiene niveles intracelulares de ATP en límites casi iguales a los encontrados en espermatozoides frescos recién obtenidos. Esto sugiere que los espermatozoides de cerdo pueden utilizar el lactato y el citrato para el mantenimiento de sus funciones básicas en ausencia de otros sustratos exógenos que puedan tener un mayor potencial energético como es el caso de la glucosa o la fructosa.

En este estudio, la medición de parámetros metabólicos así como otros parámetros más generales tales como: viabilidad y porcentaje de acrosomas alterados arrojaron resultados bastante similares a los obtenidos por Jones en un trabajo anterior (Jones., 1997). Y de dichos resultados se desprende que los espermatozoides de cerdo pueden metabolizar ambos compuestos por una vía metabólica regulada por la actividad de la LDH. Es necesario señalar que los espermatozoides de mamífero presentan una isoforma específica de LDH, tal y como ha sido descrito en otras especies (Coronel et al., 1983; Pan et al., 1983; Pawloski and Brinkmann., 1992; Jones, 1997). Mediante la realización de estudios inmunohistoquímicos pudimos comprobar que los espermatozoides de cerdo presentan un isotipo de LDH específico de esperma, localizada principalmente en la pieza principal de la cola.

En la actualidad, existen discrepancias acerca de la existencia de una vía gluconeogénica en los espermatozoides de cerdo, ya que aunque es generalmente

aceptado que el espermatozoide de cerdo carece de una vía gluconeogénica funcional (Marín et al., 2003), algunos autores indican que esta vía puede ser activa en espermatozoides de mamíferos y por tanto podría serlo en los espermatozoides de cerdo, en concordancia con hechos como el de lograr el mantenimiento de la capacitación “in vitro” en medios carentes de azúcares (Albarracín et al., 2004).

Una vez estudiados los distintos sustratos energéticos que pueden ser utilizados por los espermatozoides frescos de cerdo, nos dedicamos a la realización del tercer capítulo experimental de esta tesis cuyo fin primordial conllevó la elaboración de cuatro diluyentes experimentales que permitan optimizar los componentes de los diluyentes de conservación de semen porcino refrigerado para lograr un periodo de utilización del semen durante 8-14 días, que permita un máximo aprovechamiento de los recursos genéticos existentes.

La inseminación artificial es la tecnología reproductiva utilizada mundialmente para lograr el mejoramiento genético de las distintas especies y en la mayoría de éstas, el semen utilizado para inseminación artificial es semen congelado, ya que la congelación de espermatozoides ofrece la posibilidad de almacenamiento de este material genético por largos periodos de tiempo, eliminando además las dificultades asociadas con el traslado de animales o de semen fresco a través de largas distancias.

Sin embargo, en los actuales momentos la congelación de semen de cerdo presenta resultados poco satisfactorios a causa de su particular sensibilidad al choque frío que lo hace menos tolerante a la disminución de temperatura cuando lo comparamos con espermatozoides de otras especies domésticas (Althouse et al., 1998). Por esta razón, la práctica comercial habitual, es la de mantener semen de cerdo diluido a temperaturas entre 15-20 °C hasta ser utilizado para IA durante un periodo de tiempo bastante corto. Los centros de IA y los propietarios de granjas porcinas están muy interesados en la

consecución de un diluyente que permita un periodo de preservación del semen más largo que el obtenido con los diluyentes comerciales encontrados en el mercado.

Los diluyentes de larga duración deben preservar no sólo la viabilidad de la célula espermática, sino además, mantener la motilidad (Vyt et al., 2004) ya que ambos parámetros son muy importantes para que pueda efectuarse la fecundación.

La viabilidad del semen de cerdo diluido con diferentes diluyentes comerciales ha sido estudiada por varios autores (Jonson et al., 1982; Maxwell et al., 1987; Toniolli et al., 1996; Zou and Yang., 1999). En nuestro estudio utilizamos semen fresco de cerdo mantenido en 4 diluyentes experimentales durante un periodo de más de 7 días. Pudimos observar un declive en la viabilidad desde un 87% hasta un 66% en el transcurso de los días del experimento. Partiendo del conocimiento de que la motilidad espermática está directamente relacionada con la funcionalidad de dichas células y por tanto el patrón de movimiento del espermatozoide puede correlacionarse con pruebas de calidad seminal, tales como: Test de Resistencia Osmótica (ORT) y Test de Resistencia Hiperosmótica (HRT). (Quintero-Moreno, A., 2004).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albarracin JL, Fernandez-Novell JM, Ballester J, Rauch MC, Quintero-Moreno A, Pena A, Mogas T, Rigau T, Yanez A, Guinovart JJ, Slebe JC, Concha II, Rodriguez-Gil JE.

2004 . Gluconeogenesis-linked glycogen metabolism is important in the achievement of in vitro capacitation of dog spermatozoa in a medium without glucose. Biol Reprod. 71:1437-45.

Althouse GC, Wilson ME, Kuster C, Parsley M. 1998.Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. Theriogenology. 50:535-43.

- Coronel CE, Burgos C, Pérez de Burgos NM, Rovai LE, Blanco A. 1983. Catalytic properties of the sperm-specific lactate dehydrogenase (LDH X or C4) from different species. *J Exp Zool.* 225:379-385.
- Chun-Xia Zou and Zeng-Ming Yang. 2000. Evaluation on Sperm Quality of Freshly Ejaculated Boar Semen During In Vitro Storage Under Different Temperatures *Theriogenology* 53:1477-1488.
- Johnson LA, Aalbers JG, Willems CM, Rademaker JH, Rexroad CE Jr. 1982. Use of boar spermatozoa for artificial insemination. III. Fecundity of boar spermatozoa stored in Beltsville liquid and Kiev extenders for three days at 18 C. *J Anim Sci.* 54:132-6.
- Jones AR, Chantrill LA, Cokinakis A. 1992. Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa. *J Reprod Fertil* 94:129-134.
- Jones AR. 1997. Metabolic activity of hypotonically treated mature boar spermatozoa. *Reprod Fertil Dev.* 9:583-6.
- Jones AR, Bubb WA. 2000. Substrates for endogenous metabolism by mature boar spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 119:129-35.
- Jones AR, Connor DE. 2000. Fructose metabolism by mature boar spermatozoa. *Reprod Fertil Dev.* 12:355-9.
- Kamp G, Busselmann G, Lauterwein J. 1996. Spermatozoa: models for studying regulatory aspects of energy metabolism. *Experientia.* 52:487-94.
- Kamp G, Busselmann G, Jones N, Wiesner B, Lauterwein J. 2003. Energy metabolism and intracellular pH in boar spermatozoa. *Reproduction.* 126:517-25.
- Lehninger AL, Nelson DL and Cox MM. 1993. Feeder pathways of glycolysis. In: Lehninger AL, Nelson DL and Cox MM, eds. *Principles of Biochemistry*, 2^d Edition. New York, Worth Publishers, 422-423.

Marin S, Chiang K, Bassilian S, Lee WN, Boros LG, Fernandez-Novell JM, Centelles JJ, Medrano A, Rodriguez-Gil JE, Cascante M. 2003. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Lett.* 554:342-6.

Maxwell WMC, Johnson LA, 1997: Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology* 48, 209–219.

Mukai C, Okuno M. 2004 . Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod.* 71:540-7.

Newsholme EA and Leech AR. 1983. Sorbitol. In: Newsholme EA and Leech AR, eds. *Biochemistry for the Medical Sciences.* Chichester, John Wiley & sons, 470-471.

Pan YC, Sharief FS, Okabe M, Huang S, Li SS. 1983. Amino acid sequence studies on lactate dehydrogenase C4 isozymes from mouse and rat testes. *J Biol Chem.* 258:7005-7016

Pawlowski R, Brinkmann B. 1992. Evaluation of sperm specific lactate dehydrogenase isoenzyme C4 (LDH C4): application to semen detection in stains. *Int J Legal Med.* 105:123-126.

Toniolli R Bussi re J Courot M Magistrini M Combarous Y 1996 Effect of indole-3-acetic acid (plant auxin) on the preservation at 15oC of boar semen for artificial insemination. *Reproduction Nutrition Development* 36 503-511

Vyt P, Maes D, Dejonckheere E, Castryck F, Van Soom A. 2004. Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. *Reprod Domest Anim.* 39:8-12

CAPÍTULO VII:

CONCLUSIONES

- 1.** El uso diferenciado de los monosacáridos por parte de los espermatozoides de cerdo con fines energéticos se basa principalmente en la sensibilidad de dichos monosacáridos frente a la actividad hexoquinasa total, ya que la captación y posterior fosforilación de estos, es el primer paso importante en la regulación del metabolismo de las hexosas.
- 2.** El segundo paso de importancia en la regulación del metabolismo de las hexosas, viene dado por la modulación de la actividad piruvato quinasa, que a su vez es regulada por el equilibrio intra celular de la relación ADP/ATP.
- 3.** El ritmo metabólico del espermatozoide de cerdo esta regulado tanto por el monosacárido específico presente en el medio como por los niveles de metabolitos energéticos intra celulares.
- 4.** Los espermatozoides tienen la capacidad de metabolizar de manera eficaz sustratos no monosacáridos, como citrato y lactato, en ausencia de monosacáridos para poder suplir sus necesidades energéticas.
- 5.** Los espermatozoides de cerdo metabolizan tanto el lactato como el citrato por una vía metabólica regulada por la lactato deshidrogenasa, de la que presentan dos actividades cinéticas diferentes.

6. La eficiencia energética de los espermatozoides de cerdo puede ser optimizada mediante la combinación correcta de un monosacárido y un sustrato energético no monosacárido, lo que repercutiría en una mayor capacidad de supervivencia en condiciones de refrigeración. Esta combinación de sustratos energéticos que se utilicen por vías metabólicas diferentes, debería tomarse en cuenta a la hora de diseñar la composición exacta de los diluyentes comerciales utilizados en la conservación de semen de cerdo en refrigeración.