

Trabajos Libres

Regulación del equilibrio osmótico y canales de K^+ de espermatozoides humanos

Adriana María Caille,¹ Carlos María Zumoffen,¹ Sergio Albino Ghersevich,¹ María José Munuce^{1,2}

¹ Laboratorio de Estudios Reproductivos, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

² Servicio de Reproducción Humana y Planificación Familiar, Cátedra de Ginecología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Reproducción 2011;26:117-121

Resumen

Durante el ascenso hacia el ovocito los espermatozoides se contactan con fluidos de diferentes osmolalidades. Se ha determinado que el espermatozoide experimenta un cambio de volumen para regular la variación osmótica. Durante el manejo estándar con técnicas de recuperación como el swim up, el espermatozoide es transferido desde el plasma seminal hipertónico a un medio de cultivo isotónico. Este procedimiento envuelve una transferencia de pequeñas moléculas osmóticamente activas (K^+ , Cl^- , aniones orgánicos) y agua a través de canales sensibles al volumen. Existe evidencia de que el reto osmótico juega un rol fundamental en la adquisición de habilidad fecundante del espermatozoide. Hemos demostrado que los parámetros cinemáticos del movimiento son afectados significativamente por la quinina. Durante el manejo estándar de técnicas utilizadas in vitro, el espermatozoide es sometido a un cambio hiposmótico luego de la eyaculación, y la posibilidad de regular el equilibrio osmótico mediante canales iónicos selectivos es crucial para restablecer la función espermática. El aumento en el volumen espermático fue acompañado por una reducción de la velocidad progresiva del patrón de movimiento. Se estima que el efecto del inhibidor se hace evidente en etapas de migración espermática, y no, durante la expresión de la capacidad fecundante.

Palabras claves. espermatozoides humanos, regulación del volumen, quinina, canales de K^+ , cinética del movimiento, reacción acrosomal.

Correspondencia: Adriana María Caille
Tel. 03414804620 (Int 237).
E-mail: adricaille@yahoo.com

Osmotic regulation and K^+ channels of human spermatozoa

Summary

During their ascent towards the oocyte, spermatozoa counteracts environments, with fluids of different osmolalities. It has been found that spermatozoa exhibits a volume change to regulate osmotic challenge. During standard swim up procedure, spermatozoa are transferred from the hypertonic Seminal Plasma to the hypotonic culture medium. This process involves a transference of small osmolytes (K^+ , Cl^- , organic anions) and water out of the cell via volume-sensitive channels. Most evidence suggest that osmotic conditions play a central role in sperm fertilizing ability. We showed that the parameters motion pattern were significantly affected by Quinine. During standard in vitro procedures sperm are subjected to an hypoosmotic challenge upon ejaculation, and the regulation of osmotic equilibrium via ion selective channels is crucial for restore sperm function. The increase in sperm volume was accompanied by reduced straightline velocity of the swim path, as measured by computer-aided sperm analysis. Inhibitory activity could be associated with sperm migration and not with sperm fertilization ability.

Key words. human spermatozoa, volumen regulation, quinine, K^+ channels, kinetic of movement, acrosomal reaction.

Introducción

Los fluidos fisiológicos a los cuales están expuestos los espermatozoides desde su origen en el testículo hasta el sitio de la fecundación presentan

una osmolalidad variable. Se ha determinado que el fluido testicular presenta una osmolalidad de 280 mOsm/kgH₂O, el epididimario y plasma seminal (PS) valores de alrededor de 400 mOsm/kg y el uterino de fase ovulatoria de 284 mOsm/kg-H₂O.¹⁻⁶ El espermatozoide debe regular su volumen al migrar desde un medio de alta osmolalidad como es el PS y pasar a fluidos de osmolalidad menores como son la secreción uterina y el fluido tubario. Esto generaría un *stress* hipoosmótico para lo cual el espermatozoide debe contrarrestar este cambio intercambiando agua y moléculas osmóticamente activas.^{7,8}

Durante el manejo *in vitro* en las técnicas de reproducción asistida, los espermatozoides móviles son extraídos del PS y resuspendidos en medios de cultivo los cuales no resultan isoosmolales al PS, ya que los medios utilizados en el manejo *in vitro* de las gametas poseen osmolalidades cercanas a 280 mOsm/kgH₂O para los medios de cultivo, y en algunos casos como los crioprotectores de alrededor de 3.000 mOsm/kgH₂O.

Dado que el volumen espermático está influenciado por el equilibrio de las moléculas osmóticamente activas a través de sus membranas, fundamentalmente mediante canales,^{7,11} un defecto en la regulación del mismo podría derivar en un daño permanente que conduciría a una falla en los mecanismos de capacitación y fecundación. Como consecuencia se podría modificar o deteriorar la función espermática. El objetivo de este trabajo fue determinar la participación de canales de K^+ sensibles a quinina durante la regulación del equilibrio osmótico en espermatozoides humanos.

Metodología

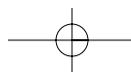
Se utilizaron muestras de semen con más de 20×10^6 /ml de espermatozoides y más de 50% de espermatozoides móviles ($n = 21$). La osmolalidad de los PS se determinó con osmómetro de punto de congelamiento (Osmomat-030). Los espermatozoides móviles se seleccionaron mediante la técnica de *swim-up* (Ham's F-10 con BSA 4 mg/ml), en ausencia (control) o presencia de quinina (Q) utilizada como inhibidor de canales de K^+ (C y Q respectivamente). Se evaluó la viabilidad (Eosina-Y), el movimiento objetivo y la cinética de movimiento (CASA), la morfología

y el índice de anomalías múltiples (IAM = cantidad de anomalías totales/espermatozoides anómalos totales) y la reacción acrosomal (RA) inducida por fluido folicular (FF) luego de una incubación de 20 hs en 5% CO₂ y tinción con *Pissum sativum* mediante microscopía de fluorescencia. En un estudio preliminar se determinó la concentración adecuada de quinina de modo que no resultara tóxica para los espermatozoides; para ello se determinó la concentración adecuada de Q (porcentaje de espermatozoides móviles y supervivencia no diferentes a C), utilizando sulfato de quinina según: Q₁: 62,5 μ M y Q₂: 125 μ M ($n = 8$). La concentración Q₂ generó una disminución significativa en la viabilidad y el porcentaje de espermatozoides móviles ($p < 0.01$ y 0.05 , respectivamente) por lo cual la concentración adecuada (Q₁) se utilizó en los estudios posteriores. La reversibilidad del efecto inhibitorio se evaluó mediante parámetros del movimiento objetivo y cinética, la morfología y el IAM y sobre la RA, luego de centrifugar los espermatozoides (600g, 5 min) y resuspender los mismos en medio control luego del tratamiento (C y Q₁). Los datos expresados como media \pm ES se analizaron con tests de Tukey y Dunnett, considerando significativo un valor de $p < 0.05$.

Resultados

La osmolalidad media de los PS fue de 386 ± 12 mOsm/kgH₂O. Al evaluar la cinética del movimiento se determinó que en presencia de Q₁, la velocidad rectilínea (VSL), la velocidad media (VAP) y la linealidad de la trayectoria (LIN) resultaron inferiores respecto al control: C (** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$; como se puede apreciar en la Figura 1) sin que se afecte la viabilidad ($> 90\%$ en todos los casos). Además, el efecto se revirtió al eliminar Q₁, volviendo a valores similares a los determinados para el control.

Para evaluar si la acción inhibitoria de la quinina, que se determinó previamente sobre el movimiento, se encontraba relacionada con un cambio en la forma del espermatozoide se evaluó la morfología a través del porcentaje de formas normales, las anomalías del flagelo y el Índice de Anomalías Múltiples (IAM). Además, se evaluó la reversibilidad de dicha acción mediante el lava-



do y resuspensión en un medio sin inhibidor.

En presencia de Q_1 el porcentaje de anomalías de flagelo fue mayor que en C (C: $12,31 \pm 1,33\%$ vs Q_1 : $17,65 \pm 1,46\%$; $p < 0.01$), las diferencias en IAM (Figura 2, C: $1,46 \pm 0,04\%$ vs Q_1 : $1,58 \pm 0,07\%$; $**p < 0.01$) se asociarían a la respuesta evidenciada sobre el flagelo.

Estos resultados apoyarían la idea de que en presencia del inhibidor, el cual no le permite regular el desequilibrio sacando K^+ , el espermatozoide al salir del PS sufriría un *stress* hipoosmótico que lo haría incluir agua a expensas de modificar la histología del flagelo. Esto explicaría que se muevan con menor linealidad ya que presentan estas modificaciones en el flagelo.

Se evaluó si el efecto también se reflejaba en una modificación de la capacidad de sufrir la RA ante un inductor fisiológico como medida indi-

recta de la habilidad fecundante de los espermatozoides. Para ello, los espermatozoides recuperados y tratados o no con Q, fueron capacitados 20 hs (ON) en un medio libre de Q y luego inducidos a responder a un inductor fisiológico de la RA, como es el fluido folicular (FF). Se evaluó también la capacidad de responder al inductor de modo significativamente mayor en todos los casos respecto de sus basales ($n = 6$, $a: p < 0.01$; Figura 3). Estos resultados indicarían que el inhibidor no modificaría ni el estado acrosomal de los espermatozoides ni su habilidad para responder al inductor fisiológico como es el FF.

Los espermatozoides expuestos a Q y luego lavados (QLavON) presentaron un mayor porcentaje de espermatozoides reaccionados (RT) respecto del control y de los bloqueados (Figura 3; $n = 6$, $*p < 0.05$ y $**p < 0.01$, respectivamente).

Figura 1. Parámetros cinéticos que describen las trayectorias del movimiento evaluados en las diferentes condiciones, control (C), presencia de inhibidor (Q_1) y los respectivos lavados (LavC y Lav Q_1) ($n = 21$, $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$).

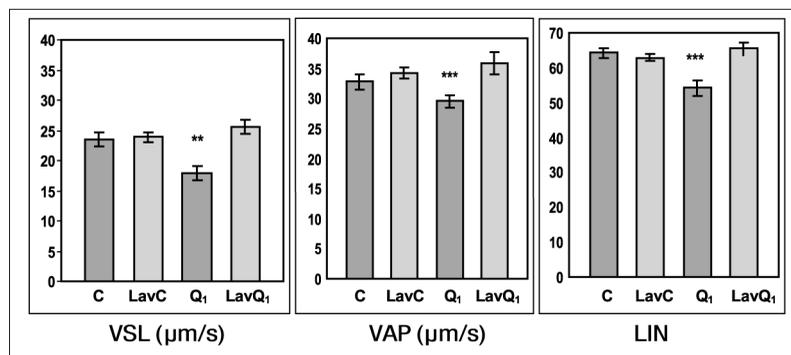
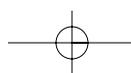
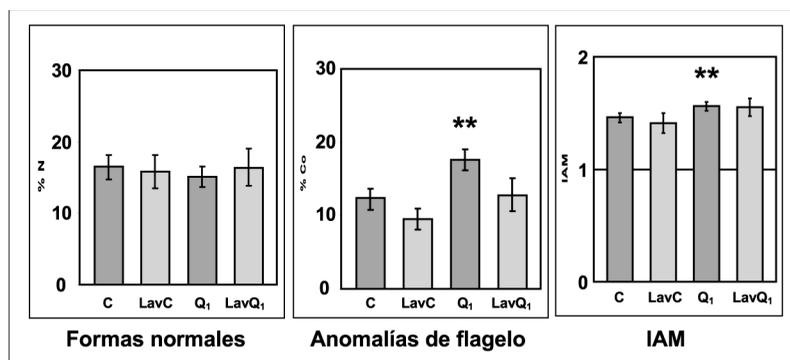


Figura 2. Evaluación de la morfología en las diferentes condiciones, control (C), presencia de inhibidor (Q_1) y los respectivos lavados (LavC y Lav Q_1) ($n = 21$; $**p < 0.01$).



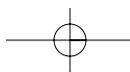
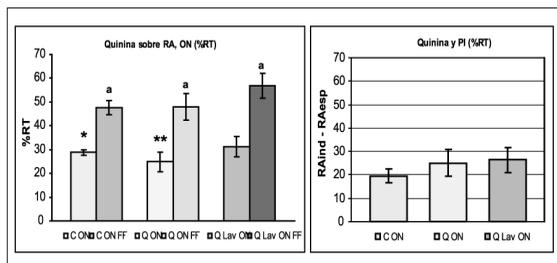


Figura 3. Evaluación de la RA en las diferentes condiciones, control (CON), control inducido (CONFF), presencia de inhibidor (QON), presencia de inhibidor inducido (QONFF) y sus respectivos lavados (QLavON y QLavONFF) ($n = 6$; $a: p < 0.01$ respecto de sus basales; $*p < 0.05$ y $**p < 0.01$ respecto del bloqueado lavado).



En la Figura 4 se presentan a modo de ejemplo algunas imágenes de los preparados de morfología y RA.

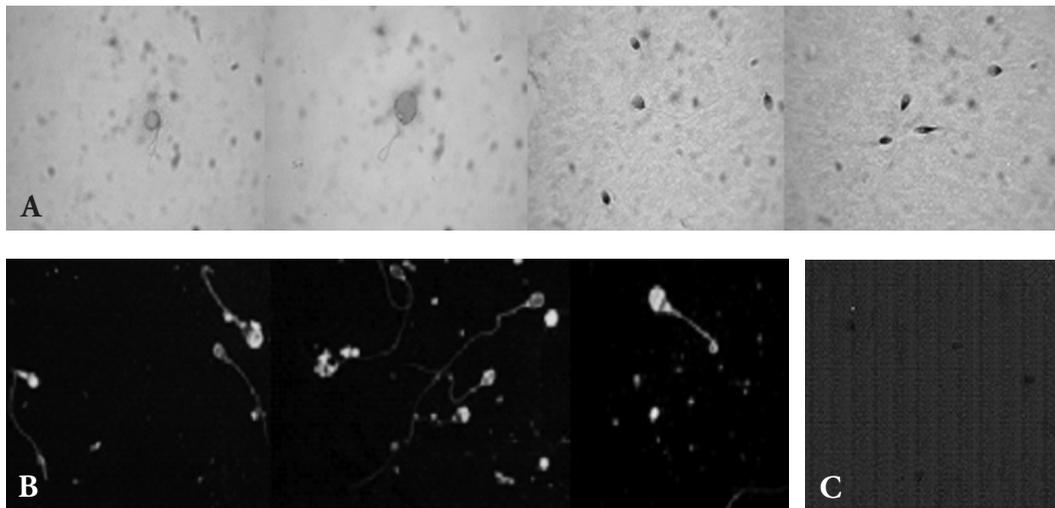
La Población Inducible (diferencia entre los

espermatozoides reaccionados luego de inducir la RA y los reaccionados sin inducción o basales, $PI = I-B$) es un parámetro que indica la población de espermatozoides con posibilidades de fecundar al ovocito. En esta etapa se evaluó si el bloqueo de los canales afectaba a la PI y si dicho efecto era reversible, o sea, si cesaba al removerse el inhibidor.

Al evaluar la población inducible total (Figura 3), se determinó que la PI no fue diferente para los distintos tratamientos. En todos los casos las PI estuvieron por encima del 15%, lo cual se puede considerar como una referencia respecto de la respuesta al inductor. La acción inhibitoria (de quinina sobre el canal de K^+) es reversible, sugiriendo una unión débil del inhibidor al espermatozoide. Estos resultados indicarían que las poblaciones que responden al inductor fisiológico no son afectadas por el inhibidor, por lo cual se estima que el efecto del inhibidor está en las etapas de migración y no de capacidad fecundante.

Figura 4. Morfología y reacción acrosomal de espermatozoides expuestos a quinina.

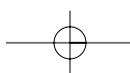
Aspecto que presentan los espermatozoides expuestos a quinina. En el panel A se aprecia la morfología al microscopio óptico, en el B con epifluorescencia (tinción con *Pisum sativum*) y en C óptico muestra original. A pesar de la presencia de malformaciones marcadas en la cabeza de algunos espermatozoides, el acrosoma está presente (aumento 1.000x).



Conclusión

Estos datos apoyan la idea de que, al menos *in vitro*, los espermatozoides funcionan como un osmómetro perfecto, y utilizan al K^+ para

equilibrar su medio interno y regular su volumen al salir del plasma seminal. En este trabajo se demostró que cuando el espermatozoide abandona el PS para comenzar el ascenso por el



tracto femenino, encuentra medios de osmolaridades menores al PS por lo que es de esperar que exista un *stress* hipoosmótico que deberá contrarrestar para regular su volumen. Cuando los espermatozoides son expuestos a un inhibidor de canales de K^+ , se observan cambios asociados a una modificación del volumen celular con alteraciones morfológicas evidentes a nivel del flagelo, lo cual se evidencia en el patrón de desplazamiento progresivo sin modificación de la capacidad fecundante del mismo, ya que no modifica el estado acrosomal de los espermatozoides ni su habilidad para responder a un inductor fisiológico como es el FF. La utilización del bloqueo de canales necesarios para la regulación de la función espermática y su asociación con una disminución en la migración espermática, podría ser empleado para fines contraceptivos, y se sugiere que sería utilizable como complemento de algún método a nivel del canal cervical o útero ya que estaría impidiendo una normal migración. Es importante tener en cuenta que la respuesta fisiológica en la regulación del volumen involucra a más de una molécula osmóticamente activa, y la relación de estos movimientos que involucran canales es terreno interesante para futuros estudios de anti-concepción. En esta etapa se evaluó si el bloqueo de los canales afectaba a la PI y si dicho efecto era reversible, o sea, si cesaba al removerse el inhibidor. El resultado encontrado indicaría que las poblaciones que responden al inductor fisiológico no son afectadas por el inhibidor, por lo cual se estima que el efecto del inhibidor está en las etapas de migración y no de capacidad para interactuar con el ovocito.

Referencias

1. Calamera J. En: El espermograma. Parámetros de fertilidad masculina. Ed.: BAESA, Buenos Aires. 1977.
2. Casslén B, Nilsson B. Human uterine fluid, examined in undiluted samples for osmolarity and the concentrations of inorganic ions, albumin, glucose, and urea. *Am J Obstet Gynecol* 1984;150(7):877-881.
3. Casslén B. Free amino acids in human uterine fluid. Possible role of high taurine concentration. *J Reprod Med* 1987;32(3):181-184.
4. Caille A. Influencia del ión potasio y la osmolaridad en los cambios fisiológicos que experimenta el espermatozoide humano incubado in-vitro. Tesis para optar al título de Magíster en Ciencias Biológicas de la Facultad de Medicina de Chile, Universidad de Chile. Enero de 1996.
5. Björndhal L, Kvist U. Séquense of ejaculation affects the spermatozoon as a carrier and its message. *Reproductive BioMedicine Online* 2003;7(4):440-448.
6. Cooper T, Barfield J, Yeung C. Changes in osmolality during liquefaction of human semen. *Int J Androl* 2005;28(1):58-60.
7. Yeung C, Anapolski M, Depenbusch M, Zitzmann M, Cooper T. Human sperm volumen regulation. Response to physiological changes in osmolality, channel blockers and potential sperm osmolytes. *Human Reprod* 2003;18(5):1029-1036.
8. Yeung C, Barfield J, Cooper T. Physiological volume regulation by spermatozoa. *Mol Cell Endocrinology* 2006;250(1-2):98-105.
9. Zhang D, Gopalakrishnan M. Sperm ion channels: review molecular targets for the next generation of contraceptive medicines? *J Androl* 2005;26(6):643-653.
10. Barfield JP, Yeung CH, Cooper TG. The effects of putative K_p channel blockers on volume regulation of murine spermatozoa. *Biol Reprod* 2005;72:1275-1281.
11. Klein T, Cooper TG, Yeung TH. The role of potassium chloride cotransporters in murine and human sperm volume regulation. *Biol Reprod* 2006;75:853-858.