

CANVIS EN LA CONCENTRACIÓ DE CARNITINA, GLUTAMAT I INOSITOL AL FLUID I ALS ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIS DE PORCÍ

Anna Pruneda,^{1*} Ching-Hei Yeung,² Sergi Bonet,¹ Elisabet Pinart,¹ Trevor G. Cooper²

¹ Grup de Reproducció Animal i Humana, Departament de Biologia-INTEA, Facultat de Ciències, Universitat de Girona Campus Montilivi, s/n. 17071 Girona. anna.pruneda@udg.es.

² Institute of Reproductive Medicine of the University Domagkstrasse, 11. D-48129 Münster, Alemanya.

Resum

El fluid epididimari conté un nombre elevat de molècules orgàniques, de les quals algunes molècules de baix pes molecular, com l'L-carnitina, el glutamat i el *myo*-inositol, estan implicades en la maduració espermàtica. En aquest estudi s'ha determinat que al llarg del conducte epididimari la concentració de glutamat i carnitina al fluid epididimari lliure d'espermatozoides augmenten, alhora que la concentració de *myo*-inositol disminueix. Al llarg de l'epidídim les variacions en la concentració d'aquests soluts no segueixen el mateix patró que les variacions en la concentració espermàtica; aquestes diferències s'atribueixen a processos de secreció o d'absorció d'aquests osmolits. El contingut de *myo*-inositol a l'interior dels espermatozoides disminueix des del caput distal, mentre que el contingut de glutamat augmenta a partir del caput distal; el contingut de carnitina dels espermatozoides epididimaris no varia al llarg del conducte. Aquests resultats donen suport a la hipòtesi que l'epidídim proporciona glutamat als espermatozoides, el qual pot ser utilitzat per a regular el seu volum en entrar en contacte amb els fluids hipotònics del tracte reproductor femení.

Paraules clau mascle reproductor porcí, epidídim, carnitina, glutamat, *myo*-inositol.

Abstract

In epididymal plasma, high-molecular-weight proteins and smaller molecules such as L-carnitine, glutamate and *myo*-inositol are thought to aid in the conversion of gametes into competent, functional cells. In this study, it has been determined that in epididymal fluid, free of spermatozoa, the concentration of *myo*-inositol decreased in a proximo-distal direction, whereas intraluminal concentrations of L-carnitine and L-glutamate increased distally. As changes in the concentration of these solutes did not parallel changes in sperm concentration, indicative of fluid resorption, this may reflect active secretion or absorption of these solutes. The content of inositol in spermatozoa fell as they moved from the distal caput whereas sperm glutamate increased from the distal caput to more distal regions and carnitine content remained unchanged during epididymal transit. These data are consistent with the hypothesis that epididymal provision of glutamate prepares porcine spermatozoa for the hypotonic challenge of fluids in the sow.

Key words boar, epididymis, carnitine, glutamate, *myo*-inositol.

INTRODUCCIÓ

El fluid epididimari conté un elevat nombre de molècules orgàniques de baix pes molecular i solubles en aigua presents a elevades concentracions (mM) (Cooper, 1998); algunes d'aquestes molècules són l'L-carnitina, el glutamat i el *myo*-inositol. Es creu que l'L-carnitina està implicada en la producció d'energia per a la motilitat espermàtica (Ng *et al.*, 2004), i que el glutamat pot ser utilitzat com a substrat oxidatiu per al metabolisme aeròbic dels espermatozoides

(Mann, 1964) o pot millorar la supervivència espermàtica (Tyler i Rothschild, 1951). D'altra banda, el *myo*-inositol un cop transformat a fosfatidilinositol és metabolitzat activament pels espermatozoides i es creu que té un efecte estimulador de la motilitat, la respiració i la glicòlisi dels espermatozoides (Scott i Dawson, 1968). A més, es coneix que aquestes molècules són utilitzades per les cèl·lules somàtiques com a osmolits reguladors de volum (Fürst *et al.*, 2002). Recentment s'ha proposat que els espermatozoides en procés de maduració podrien adquirir

aquests osmolits, els quals participarien en la regulació del volum espermàtic als fluids hipoosmòtics del tracte reproductor femení (Cooper i Yeung, 2003).

L'objectiu d'aquest estudi és determinar com varia la concentració de carnitina, *myo*-inositol i glutamat al fluid i als espermatozoides de les diferents regions epididimàries, i si aquestes substàncies actuen com a osmolits per als espermatozoides en procés de maduració a l'epidídim de porcí.

MATERIAL I MÈTODES

En aquest estudi es van utilitzar sis mascles Pietrain de deu mesos d'edat; de cadascun d'ells es van canular les sis regions epididimàries (caput proximal i distal, corpus proximal i distal, i cauda proximal i distal) per tal d'obtenir-ne el fluid luminal sense diluir. Es va analitzar la concentració espermàtica dels continguts luminals sense diluir i, a continuació, es van processar per tal d'obtenir per separat els espermatozoides epididimaris i el fluid lliure d'espermatozoides.

Per a l'extracció d'osmolits dels espermatozoides epididimaris, se'ls van aplicar 3 polsos d'ultrasons de 3 segons amb el sonicador (25 W; punta d'1,5 mm; Vibra-Cell-Sonicator, Sonics & Materials

Inc. Danbury, Conn, EUA), tot mantenint la mostra en gel.

Totes les anàlisis dels osmolits orgànics es van realitzar amb assajos fluorimètrics modificats per plaques de 96 pouets i es van llegir amb un espectrofluorímetre (SpectraMax GeminiXS Molecular Devices GmbH, Munic, Alemanya). L'anàlisi de la concentració de carnitina es va fer seguint el protocol descrit per Maehara *et al.* (1988). En aquest mètode, l'L-carnitina és convertida a acetilcarnitina per la carnitina-acetiltransferasa (CAT), alhora que l'acetilcoenzim A (AcCoA) és convertit a coenzim A (CoA). El CoA reacciona amb el N-(4-(2-benzimidazolil)-fenil)-maleimida (BIPM) per a donar lloc a un producte fluorescent (CoA-BIPM) que pot ser quantificat amb excitació a 315 nm i emissió a 370 nm (figura 1a). En el cas de l'L-glutamat, aquest és convertit a α -oxoglutarat, NH_3 i H_2O_2 per la glutamat-oxidasa (Glut Ox). El glutamat és regenerat per l'acció de l'L-alanina- i l'L-glutamat-piruvat-transaminasa (APT i GPT, respectivament) que incrementen la producció d' H_2O_2 . Aquest H_2O_2 en presència de la Horse Radish Peroxidasa (HRP) converteix l'Amplex Red a resorufina, que podrà ser quantificada per excitació a 560 nm i emissió a 587 nm (figura 1b). Per a l'anàlisi de la concentració d'inositol es va utilitzar el protocol descrit per O'Neill *et al.* (1998) i Yeung *et al.* (2004). En aquest mètode, el *myo*-inosi-

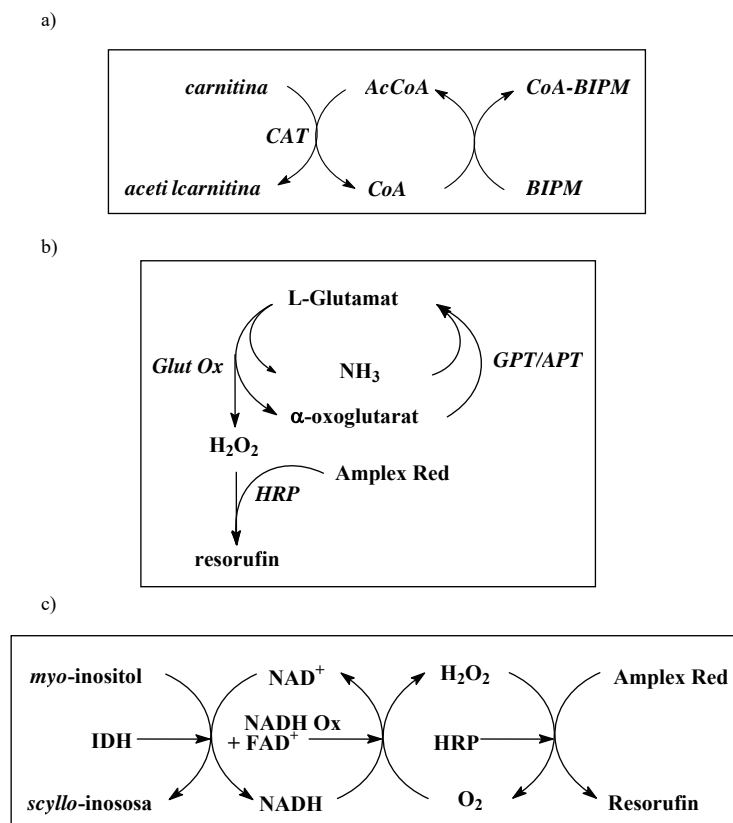


Figura 1 Seqüència de reaccions de l'assaig de la concentració de carnitina (a), glutamat (b) i *myo*-inositol (c).

tol és convertit a *scyllo*-inososa per la inositol-deshidrogenasa (IDH), mentre que el dinucleòtid de nicotina i adenina (NAD^+) és reduït (NADH). La NADH-oxidasa (NADH Ox), juntament amb el nucleòtid de flavina i adenina (FAD^+), oxida el NADH i converteix l'oxigen a H_2O_2 . Finalment, l'Amplex Red en presència de l'HRP reacciona amb l' H_2O_2 per a produir resorufina, que serà quantificada amb excitació a 530 nm i emissió a 590 nm (figura 1c).

Els resultats obtinguts de l'anàlisi de la concentració d'osmolits orgànics s'expressen com la mitjana \pm SEM ($n = 6$). L'anàlisi estadística de les dades es va dur a terme amb el programa SigmaStat (versió 3.1; SPSS Inc, Erkrath, Alemanya). Les diferències entre regions epididimàries es van analitzar amb el test de l'ANOVA d'un factor; les dades que no complien la normalitat o l'homoscedasticitat es van analitzar amb una ANOVA d'un factor en rangs. Per a fer les comparacions *post-hoc* es va utilitzar el mètode de Holm-Sidak, i les diferències es van considerar estadísticament significatives quan $P < 0,05$.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

La concentració espermàtica augmenta al caput epididimari, per bé que del caput distal al corpus proximal disminueix, abans de tornar a augmentar de nou fins al cauda epididimari (figura 2).

Les concentracions de carnitina i de glutamat del fluid luminal augmenten al llarg del conducte epididimari, i assoleixen el seu màxim al cauda proximal (10 mM i 23 mM, respectivament) (figura 3). La concentració espermàtica no segueix el mateix patró que la concentració de carnitina i glutamat; per tant, l'augment de la concentració d'aquests osmolits no

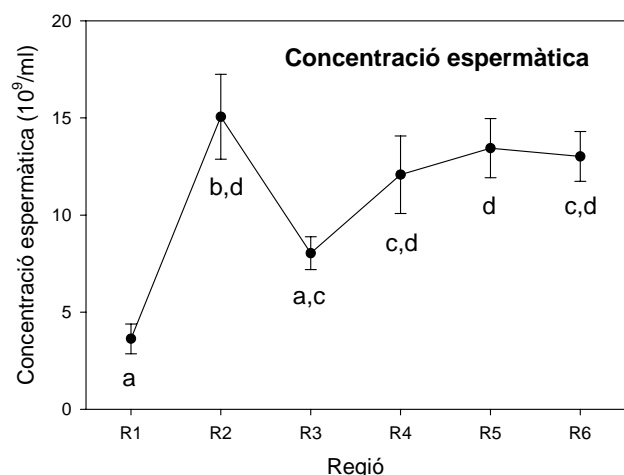


Figura 2 Concentració espermàtica (mitjana \pm SEM) al fluid de les sis regions epididimàries (R1-R6) dels sis mascles reproductors porcíns. a-d: els valors amb la mateixa lletra no difereixen significativament entre regions.

és conseqüència d'una reabsorció d'aigua, sinó que s'atribueix a processos de secreció o de síntesi de carnitina i glutamat. L'augment de la concentració de carnitina al llarg del conducte epididimari ja havia estat descrit prèviament en porcí (Jeulin i Lewin, 1996). Jeulin *et al.* (1994) demostraren que la carnitina no se sintetitza a l'epidídim, sinó que és transportada des de la sang; posteriorment, s'ha descrit l'existència de transportadors de carnitina a l'epidí-

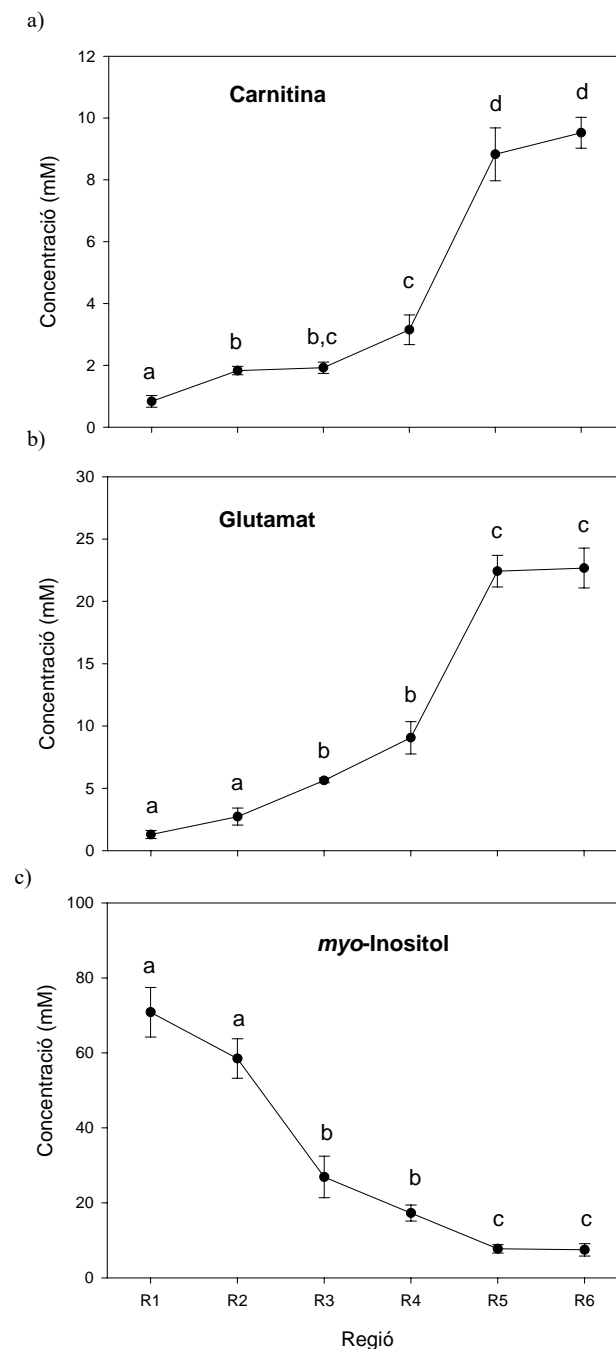


Figura 3 Concentració (mitjana \pm SEM) de carnitina (a), glutamat (b) i *myo*-inositol (c) al de les sis regions epididimàries (R1-R6) dels sis mascles reproductors porcíns. a-d: els valors amb la mateixa lletra no difereixen significativament entre regions.

dim de rates i ratolins (Rodríguez *et al.*, 2002; Cooper *et al.*, 2003).

En els espermatozoides de raça Pietrain la concentració de carnitina no varia al llarg del conducte epididimari (0,28 nmol/10⁶ spz) (figura 4), mentre que en els espermatozoides de la raça Large White augmenta de manera progressiva (Jeulin i Lewin, 1996). En altres espècies, com hámsters, conills, marrans i toros (Inskeep i Hammerstedt, 1982; Casillas *et al.*,

1984), també s'ha descrit un augment de la concentració de carnitina dels espermatozoides al llarg de l'epidídim.

La concentració de glutamat del fluid augmenta de manera progressiva al llarg del conducte epididimari fins a 23 mM al cauda distal (figura 3). Johnson *et al.* (1972) també van trobar una concentració similar de glutamat al fluid del cauda distal de mascles porcins, per bé que aquests autors no van mesurar la concentració d'aquest osmolit a la resta de regions epididimàries. Contràriament, en rata s'ha determinat que la concentració de glutamat disminueix al llarg del conducte epididimari (Hinton, 1990). En ratolí, s'ha descrit la presència de transportadors, que transporten glutamat de la sang cap a la llum del conducte epididimari (Cooper i Yeung, 2003).

Entre el caput proximal i el caput distal s'ha determinat una disminució de la concentració de glutamat en els espermatozoides, tot i que al corpus i al cauda epididimaris aquesta concentració augmenta fins a 0,4 nmol/10⁶ spz (figura 4). Aquesta disminució inicial podria reflectir que els espermatozoides estan utilitzant el glutamat per al seu metabolisme, o que els espermatozoides són permeables al glutamat i que, per tant, es produeix un flux de glutamat cap al fluid epididimari. D'altra banda, l'augment de concentració que s'observa als espermatozoides del corpus i el cauda epididimaris podria ser conseqüència de l'adquisició de glutamat des del fluid epididimari.

A diferència de la carnitina i el glutamat, la concentració d'inositol al fluid luminal disminueix des del caput proximal (70 mM) fins al cauda distal (7,5 mM) (figura 3). Hinton *et al.* (1980) determinaren, també en porcí, que la concentració d'inositol al cauda distal era d'1 mM, per bé que en aquest cas tampoc no van mesurar-ne la concentració a la resta de regions epididimàries. Existeixen diferències entre espècies en els nivells d'inositol del fluid epididimari; així, en conills, primats, marrans i toros (Voglmayr i Amann, 1973; Hinton *et al.*, 1980) la concentració d'inositol disminueix al llarg del conducte, mentre que en rates augmenta (Voglmayr, 1974). A l'epidídim de ratolí (Xu i Cooper, observacions no publicades), però no de gos (Kwon *et al.*, 1992), s'ha determinat la presència d'un transportador d'inositol dependent de sodi, tot i que no es coneix en quina direcció transporta aquest substrat.

La concentració d'inositol als espermatozoides epididimaris disminueix des del caput distal fins al cauda distal (0,2 nmol/10⁶ espermatozoides) (figura 4), paral·lelament a la concentració d'inositol del fluid epididimari; això suggereix que els espermatozoides són permeables a l'inositol o que l'estan transformant a fosfatidilinositol. Voglmayr i Amann

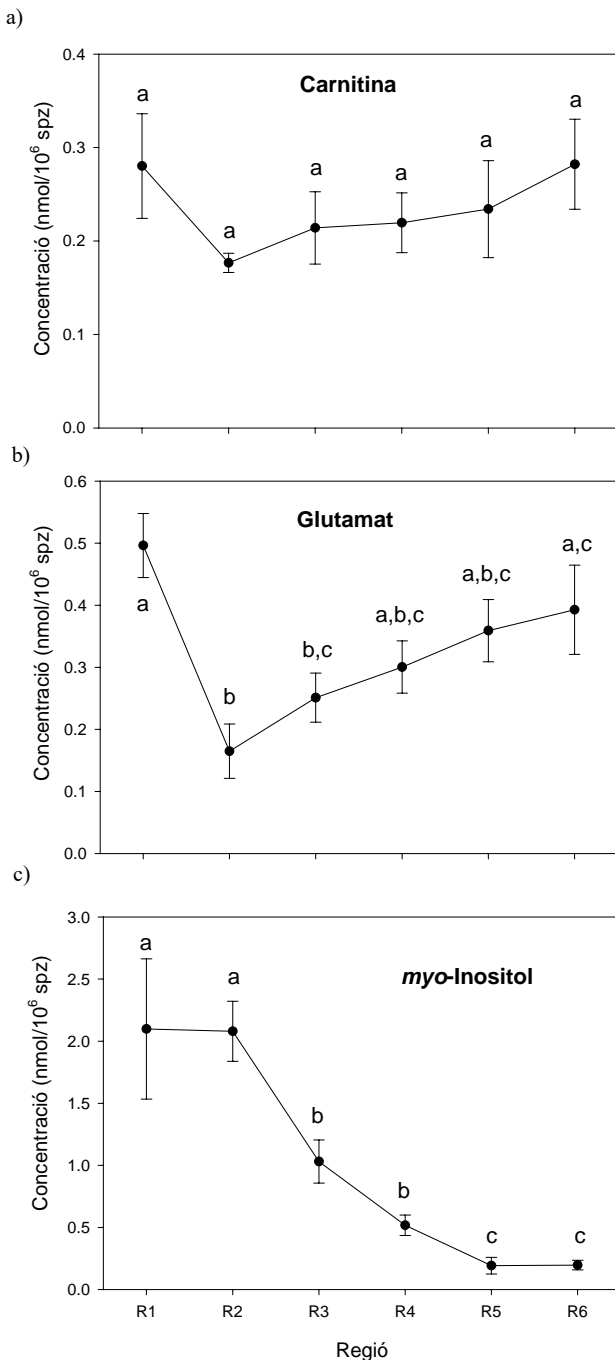


Figura 4 Contingut (mitjana \pm SEM) de carnitina (a), glutamat (b) i myo-inositol (c) als espermatozoides de les sis regions epididimàries (R1-R6) dels sis mascles reproductors porcins. a-c: els valors amb la mateixa lletra no difereixen significativament entre regions.

(1973) van demostrar que en conill el contingut d'inositol dels espermatozoides testiculars era quatre vegades superior al dels espermatozoides del cauda epididimari, d'acord amb els resultats obtinguts en el present treball.

Així doncs, al fluid epididimari la concentració de glutamat i carnitina augmenten, alhora que la concentració de *myo*-inositol decreix. El contingut de *myo*-inositol dels espermatozoides disminueix des del caput distal, mentre que el contingut de glutamat augmenta a partir del caput distal; el contingut de carnitina dels espermatozoides epididimaris no varia al llarg del conducte. Aquests resultats donen suport a la hipòtesi que l'epidídim proporciona glutamat als espermatozoides, i que aquest glutamat pot ser utilitzat pels espermatozoides per a regular el seu volum en entrar en contacte amb els fluids hipotònics del tracte reproductor femení.

BIBLIOGRAFIA

- CASILLAS, E. R.; VILLALOBOS, P.; GONZALES R. (1984). «Distribution of carnitine and acetylcarnitine in the hamster epididymis and in epididymal spermatozoa during maturation». *J. Reprod. Fertil.*, 72: 197-201.
- COOPER, T. G. (1998). «EPIDIDYMIS». A: NEILL, J. D.; KNOBIL, E. [ed.] *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego: Academic Press, p. 1-17.
- COOPER, T. G.; YEUNG, C. H. (2003). «Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of cytoplasmic droplets». *Micros. Res. and Tech.*, 61: 28-38.
- COOPER, T. G.; WAGENFELD, A.; CORNWALL, G. A.; HSIA, N.; CHU, S. T.; ORGBIN-CRIST, M.-C.; DREVET, J.; VERNET, P.; AVRAM, C.; NIESCHLAG, E.; YEUNG, C.-H. (2003). «Gene and protein expression in the epididymis of infertile *c-ros* receptor tyrosine kinase-deficient mice». *Biol. Reprod.*, 69: 1750-1762.
- FÜRST, J.; GSCHWENTNER, M.; RITTER, M.; BOTTA, G.; JAKAB, M.; MAYER, M.; GARAVAGLIA, L.; BAZZINI, C.; RODIGHIERO, S.; MEYER, G.; EICHMULLER, S.; WOLL, E.; PAULMICHL, M. (2002). «Molecular and functional aspects of anionic channels activated during regulatory volume decrease in mammalian cells». *Pflugers Archives*, 444: 1-25.
- HINTON, B. T. (1990). «The testicular and epididymal luminal amino acid microenvironment in the rat». *J. Androl.*, 11: 498-505.
- HINTON, B. T.; WHITE, R. W.; SETCHELL, B. P. (1980). «Concentrations of *myo*-inositol in the luminal fluid of the mammalian testis and epididymis». *J. Reprod. Fertil.*, 58: 395-399.
- INSKEEP, P. B.; HAMMERSTEDT, R. H. (1982). «Changes in metabolism of ram sperm associated with epididymal transit or induced by endogenous carnitine». *Biol. Reprod.*, 27: 735-743.
- JEULIN, C.; LEWIN, L. M. (1996). «Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa». *Hum. Reprod.*, 2: 87-102.
- JEULIN, C.; DACHEUX, J. L.; SOUFIR, J. C. (1994). «Uptake and release of free L-carnitine by boar epididymal spermatozoa in vitro and subsequent acetylation rate». *J. Reprod. Fertil.*, 100: 263-271.
- JOHNSON, L. A.; PURSEL, V. G.; GERRITS, R. J.; THOMAS, C. H. (1972). «Free amino acid composition of porcine seminal, epididymal and seminal vesicle fluids». *J. Anim. Sci.*, 34: 430-434.
- KWON, H. M.; YAMAUCHI, A.; UCHIDA, S.; PRESTON, A. S.; GARCIA-PEREZ, A.; BURG, M. B.; HANDLER, J. S. (1992). «Cloning of the cDNA for a Na⁺/*myo*-inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein». *J. Biol. Chem.*, 267: 6297-6301.
- MAEHARA, M.; KINOSHITA, S.; WATANABE, K. (1988). «A simple fluorometric method for the determination of serum free carnitine». *Clin. Chim. Acta*, 171: 311-316.
- MANN, T. (1964). *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*. Nova York: John Wiley and Sons.
- NG, C. M.; BLACKMAN, M. R.; WANG, C.; SWERDLOFF, R. S. (2004). «The role of carnitine in the male reproductive system». *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1033: 177-188.
- O'NEILL, R. B.; DILLON, S. A.; MORGAN, P. M. (1998). «A coupled enzyme assay for *myo*-inositol». *Biochem. Soc. Trans.*, 26, S84.
- RODRIGUEZ, C. M.; LABUS, J. C.; HINTON, B. T. (2002). «Organic cation/carnitine transporter, OCTN2, is differentially expressed in the adult rat epididymis». *Biol. Reprod.*, 67: 314-319.
- SCOTT, T. W.; DAWSON, R. M. C. (1968). «Metabolism of phospholipids by spermatozoa and seminal plasma». *Biochem. J.*, 108: 457-463.
- TYLER, A.; LORD ROTHSCHILD. (1951). «Metabolism of sea urchin spermatozoa and induced anaerobic motility in solution of amino acids». *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 76: 52.
- VOGLMAYR, J. (1974). «Alpha-chlorohydrin-induced changes in the distribution of free *myo*-inositol and prostaglandin F^{2α}, and synthesis of phosphatidylinositol in the rat epididymis». *Biol. Reprod.*, 11: 593-600.
- VOGLMAYR, J. K.; AMANN, R. P. (1973). «The distribution of free *myo*-inositol in fluids, spermatozoa and tissues of the bull genital tract and observations on its uptake by the rabbit epididymis». *Biol. Reprod.*, 8: 504-513.
- YEUNG, C. H.; ANAPOLSKI, M.; SETIAWAN, I.; LANG, F.; COOPER, T. G. (2004). «Effects of putative epididymal osmolytes on sperm volume regulation of fertile and infertile *c-ros* transgenic mice». *J. Androl.*, 25: 216-223.