

IMPLICACIÓ DEL CANAL ANIÒNIC DEPENDENT DE VOLTATGE (VDAC2) EN LA CAPACITACIÓ *IN VITRO* I LA REACCIÓ ACROSÒMICA INDUÏDA AMB PROGESTERONA DE L'ESPERMATOZOIDE DE PORCÍ

Sandra Martínez-Abad^{1,*}, Beatrice Gadani¹, Joan E. Rodríguez-Gil², Sergi Bonet¹, Marc Yeste^{1,*}

¹Bioteconologia de la Reproducció (TechnoSperm), Departament de Biologia. Universitat de Girona.

²Departament de Medicina i Cirurgia Animal, Universitat Autònoma de Barcelona

*sandra.ma@gmail.com, marc.yeste@udg.edu

Resum

Els canals iònics tenen un paper fonamental durant la capacitació espermàtica. A banda dels canals CatSper, l'espermatozoide té altres canals iònics, el paper dels quals no és del tot conegut. En aquest treball, es va estudiar la implicació del canal iònic dependent de voltatge 2 (VDAC2) durant la capacitació de l'espermatozoide porcí. Amb aquest objectiu, els espermatozoides es van capacitar *in vitro* amb i sense presència de dos inhibidors diferents (erastina i olesoxime) a dues concentracions diferents (10 μ M i 100 μ M). La presència dels inhibidors va comportar, en ambdós casos, una reducció de la motilitat espermàtica tant total com progressiva. Tanmateix, mentre que la presència d'erastina 100 μ M va reduir el percentatge d'espermatozoides no capacitats, l'addició d'olesoxime va inhibir l'increment de la fluïdesa de membrana característic de la capacitació. Aquests resultats suggereixen que la VDAC2 està implicada en la regulació de la capacitació espermàtica, per bé que els mecanismes pels quals l'erastina i l'olesoxime duen a terme els seus efectes inhibitoris són diferents.

Paraules clau: espermatozoide, VDAC2, capacitació, erastina, olesoxime.

Abstract

Ion channels play a pivotal role for mammalian sperm capacitation. Although CatSperm channels are crucial for that process, the function of other ion channels that have identified in mammalian sperm still remains unknown. This work was based on the pig model and aimed at addressing whether voltage-dependent anion channel (VDAC2) was involved in sperm capacitation. With this purpose, boar spermatozoa were *in vitro* capacitated with or without the presence of two separate specific VDAC2-inhibitors (erastin and olesoxime) at two different concentrations (10 μ M and 100 μ M). Sperm motility was significantly decreased when the aforementioned inhibitors were present. However, while 100 μ M erastin reduced the proportion of uncapacitated sperm, adding the capacitation medium with 100 μ M olesoxime did not cause that decrease, which is a typical feature of sperm capacitation. While these results suggest that VDAC2 is involved in the regulation of sperm capacitation, they also indicate that the pathways through which erastin and olesoxime exert their VDAC2-inhibitory effects differ.

Key words: spermatozoa, VDAC2, capacitation, erastin, olesoxime.

INTRODUCCIÓ

La capacitació és un procés fisiològic molt complex que inclou els canvis moleculars necessaris perquè l'espermatozoide adquireixi la capacitat de fecundar l'òcit. Aquest procés es pot dividir en dos tipus d'esdeveniments: lents i ràpids (Yeste, 2013). Els esdeveniments ràpids s'inicien a l'ejaculació, gràcies a la presència de calci i bicarbonat al medi. Ambdós components són transportats a l'interior de la cèl·lula i activen una adenilat ciclasa soluble, la qual cosa incrementa els nivells intracel·lulars de d'AMP cíclic (cAMP). Aquest aug-

ment comporta l'activació de la proteïna quinasa dependent de cAMP (PKA) que, al seu torn, activa altres vies de senyalització necessàries per la capacitació espermàtica i la posterior reacció acrosòmica. (Visconti, 2009)

Els esdeveniments lents s'inicien quan l'espermatozoide arriba a la trompa de Fal·lopi o oviducte. En aquest moment, s'alteren els patrons de motilitat de l'espermatozoide (hiperactivació) i les membranes acrosòmica externa i plasmàtica es fusionen. La presència de l'albumina com a acceptor lipídic ajuda a eliminar el colesterol de la membrana i es produeix la fosforilació dels residus de tirosina d'algunes proteïnes

crucials, com la proteïna d'unió a l'acrosina (ACRBP, Visconti, 2009).

Els canal iònics involucrats en el transport del calci tenen una gran rellevància tant en els esdeveniments ràpids com en els lents. A més dels canals iònics CatSper, característics dels espermatozoides, hi ha d'altres proteïnes involucrades en el transport del calci. Una d'aquestes proteïnes és el canal aniònic dependent de voltatge 2 (VDAC2), recentment identificat a l'espermatozoide de mamífer (Vilagran *et al.*, 2014). La VDAC2 és una proteïna present a totes les cèl·lules eucariotes i es caracteritza per presentar llocs d'unió al calci i fer possible el flux d'aquest ió a través de la membrana (Kwon *et al.*, 2015). Mitjançant estudis d'immunolocalització, s'ha determinat que la VDAC2 no només està present a la membrana externa mitocondrial sinó que també es troba a les fibres denses del flagel i a l'acrosoma (Kwon *et al.*, 2013). La VDAC2 també està relacionada amb l'espermatoogènesi, la maduració espermàtica i la regulació de la motilitat espermàtica (Liu *et al.*, 2010). Tanmateix, i malgrat el seu interès, no s'han dut a terme estudis sobre el paper d'aquest canal iònic durant la capacitat espermàtica.

Així doncs, l'objectiu d'aquest estudi va ser determinar la implicació de la VDAC2 en la capacitat de l'espermatozoide de mamífer, emprant el model porcí. Amb aquest propòsit, els espermatozoides de porcí es van capacitar *in vitro* i la reacció acrosòmica es va induir amb progesterona. Això es va dur a terme en presència de dos inhibidors específics d'aquest canal: l'erastina i olesoxime (també conegut com a TRO19622). Ambdós inhibidors entren a la cèl·lula per difusió passiva i s'uneixen a la VDAC2, alterant el transport iònic a través d'aquest canal mitocondrial (Yagoda *et al.*, 2007; Bordet *et al.*, 2010). Com a paràmetres espermàtics, es van avaluar la motilitat i viabilitat espermàtiques, i el desordre lipídic de la membrana plasmàtica.

MATERIALS I MÈTODES

Animals i mostres

Es van utilitzar un total de 14 ejaculacions provinents de mascles sans, sexualment madurs i sense problemes de fertilitat. Aquest mascles estaven sotmesos a les mateixes condicions controlades de temperatura i alimentació. L'extracció del semen la va fer el personal tècnic de la granja (Gepork S.L., Roda de Ter, Barcelona), mitjançant el mètode de la mà enguantada i la munta sobre maniquí. La fracció rica de l'esperma es va filtrar amb una gasa per eliminar la fracció gelatinosa. Posteriorment, es va diluir amb medi MR-A (Kubus S.A., Madrid) i el volum resultant es va dividir en dosis seminals

de 90 µL (3×10^9 espermatozoides per dosi). Finalment, les dosis comercials es van refrigerar a 17°C i es van transportar al laboratori a la mateixa temperatura.

Capacitació espermàtica in vitro i reacció acrosòmica induïda per la progesterona

Per a la capacitat espermàtica, es van prendre 50 µL de dosi seminal i es van centrifugar a 600×g durant 5 min. El *pellet* es va resuspendre amb medi de capacitat (TALP). La composició del medi va ser la següent: 4,772 mg·mL⁻¹ Hepes, 6,552 mg·mL⁻¹ NaCl, 0,232 mg·mL⁻¹ KCl, 0,9 mg·mL⁻¹ Glucosa, 2,432 mg·mL⁻¹ L-Lactat, 0,112 mg·mL⁻¹ Piruvat sòdic, 0,1 mg·mL⁻¹ MgSO₄, 0,66 mg·mL⁻¹ CaCl₂, i 4,84 mg·mL⁻¹ albúmina sèrica bovina. El pH es va ajustar a 7,4. La capacitat espermàtica es va dur a terme durant 4 h a 38,5°C i 5% CO₂. A les 4h (240 min), es va induir la reacció acrosòmica amb progesterona (concentració final: 10 µg/mL; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Estats Units). Les mostres es van avaluar a 0, 120, 240, 270 i 300 min.

Inhibidors: erastina i olesoxime

Es van assajar, juntament amb el control, dues concentracions diferents (10 µM i 100 µM) d'erastina i olesoxime (TRO19622). Ambdós reactius es van obtenir de Sigma-Aldrich.

Citometria de flux

Tant la viabilitat espermàtica com el desordre lipídic de la membrana es van determinar amb un citòmetre de flux (Cell laboratory QuantaSC™; Beckman Coulter; Fullerton, Califòrnia, Estats Units). Les mostres es van excitar amb un làser d'argó (488 nm) a una potència de 22 mW, i es van utilitzar els sensors FL1 (DRLP: 550 nm, BP: 525 nm, detecció: 505-545 nm), i FL3 (LP: 670 nm, detecció: 670 ± 30 nm). Es van analitzar 10.000 cèl·lules per mostra i cada mostra es va avaluar tres vegades.

Viabilitat espermàtica

La viabilitat espermàtica es va determinar mitjançant un kit comercial (LIVE/DEAD®; Molecular Probes, Invitrogen; Eugene, Oregon, Estats Units) i els espermatozoides es van incubar amb SYBR-14 (concentració final: 100 µM) durant 10 min i després amb iodur de propidi (PI, concentració final: 12 µM) durant 5 minuts. Ambdues incubacions es van dur a terme a 38°C i en absència de llum. La fluorescència emesa pel SYBR va ser registrada amb el filtre FL1, mentre que el sensor FL3 va captar l'emesa pel PI.

Alteració dels lípids de membrana

Aquesta anàlisi es va dur a terme com a indicador de la capacitat espermàtica. Es van combinar dos fluorocroms, M540 i YO-PRO-1 (Molecular Probes), a una concentració final de 2.6 μM i 25 nM, respectivament. Les mostres es van incubar durant 10 min a 38°C i en absència de llum. La fluorescència emesa per la M540 va ser capturada pel sensor FL3 mentre que la fluorescència emesa pel YO-PRO va ser captada pel filtre FL1.

Anàlisis de la motilitat espermàtica

La motilitat espermàtica es va determinar mitjançant una cambra de Makler i un sistema d'anàlisi computeritzat del semen (CASA; ISAS, Proiser, València). L'anàlisi de les mostres es va dur a terme amb un microscopi òptic de contrast de fase (BX41 Olympus; Olympus Europe GmbH, Hamburg, Alemanya) equipat amb una càmera de vídeo. Aquesta anàlisi va permetre classificar els espermatozoides d'acord amb els patrons cinemàtics, incloent la velocitat i el tipus de moviment de la seva trajectòria. D'aquesta manera, els espermatozoides es van classificar com a mòbils progressius, mòbils no progressius i estàtics. Es van fer tres recomptes de 1.000 espermatozoides cadascun.

Anàlisi estadística de les dades

Per a l'anàlisi de les dades, es va utilitzar un paquet estadístic IBM SPSS 21.0 (Chicago, Illinois, Estados Unidos). Després de comprovar que la distribució de les dades era normal i les variàncies eren homogènies, es va utilitzar un model lineal mixt i el test post-hoc de Sidak. Les variables dependents van ser els paràmetres espermàtics, el factor entre subjectes va ser el tractament (control, erastin i olesoxime a les concentracions pertinents), i el factor dins dels subjectes va ser el temps d'incubació (0, 120, 240, 270 i 300 min). El nivell de significació es va establir en $p \leq 0,05$.

RESULTATS

La Figura 1 mostra els percentatges de motilitat progressiva, total, viabilitat espermàtica i espermatozoides amb desordre lipídic baix.

Motilitat progressiva

Es va observar una tendència negativa a tots els tractaments, inclòs el control, que es va estabilitzar a partir dels 240 minuts. Quant a la comparació amb els altres tractaments, es va determinar que la presència d'oleso-

xime 10 μM incrementava el percentatge d'espermatozoides mòbils progressius. Per contra, l'addició d'erastina a 100 μM va reduir significativament aquest percentatge. Al final de l'experiment, es va observar que els tractaments amb erastina 10 i 100 μM presentaven una motilitat progressiva significativament inferior a la del control (Figura 1A).

Motilitat total

Pel que fa a la motilitat total (Figura 1B), també es va observar una tendència cap a la reducció d'aquest paràmetre atès que, tot i partir d'un percentatge d'aproximadament un 65% d'espermatozoides mòbils totals, només un 20% dels espermatozoides eren mòbils al concloure l'experiment. No obstant això, es van observar diferències significatives entre tractaments de manera similar a la motilitat progressiva. Així, el percentatge d'espermatozoides mòbils totals tant després d'afegir erastina 10 μM com olesoxime a la mateixa concentració incrementaven els percentatges d'espermatozoides mòbils totals als 120 min. En canvi, la presència d'erastina a una concentració de 100 μM tenia l'efecte oposat. Aquest efecte de reducció de la motilitat per part de l'erastina 100 μM es va observar també als 240, 270 i 300 min. Finalment, la presència d'erastina 10 μM també va reduir significativament el percentatge d'espermatozoides mòbils totals als 300 min.

Viabilitat espermàtica

La viabilitat espermàtica (Figura 1C) es va avaluar mitjançant el percentatge d'espermatozoides amb la membrana plasmàtica intacta (SYBR14⁺/PI⁻). Els resultats obtinguts mostren de nou una tendència a la baixa en tots els tractaments, llevat del tractament amb olesoxime 100 μM que, des dels 120 min i fins al final de l'experiment va presentar uns percentatges d'espermatozoides viables significativament superiors al control. Per contra, l'addició d'erastina a una concentració de 100 μM va resultar en una reducció significativa de la viabilitat espermàtica des dels 120 min i fins a la conclusió de l'experiment.

Desordre lipídic de la membrana plasmàtica

Es va avaluar el percentatge d'espermatozoides viables que presentaven una membrana intacte amb un desordre lipídic baix (no capacitats, M540/YO-PRO-1⁻) (Figura 1D). De manera similar a l'anàlisi de la viabilitat, es va observar una tendència a la disminució del percentatge d'espermatozoides amb baix desordre lipídic a la seva membrana, la qual cosa era concomitant amb un increment del percentatge d'espermatozoides capacitats

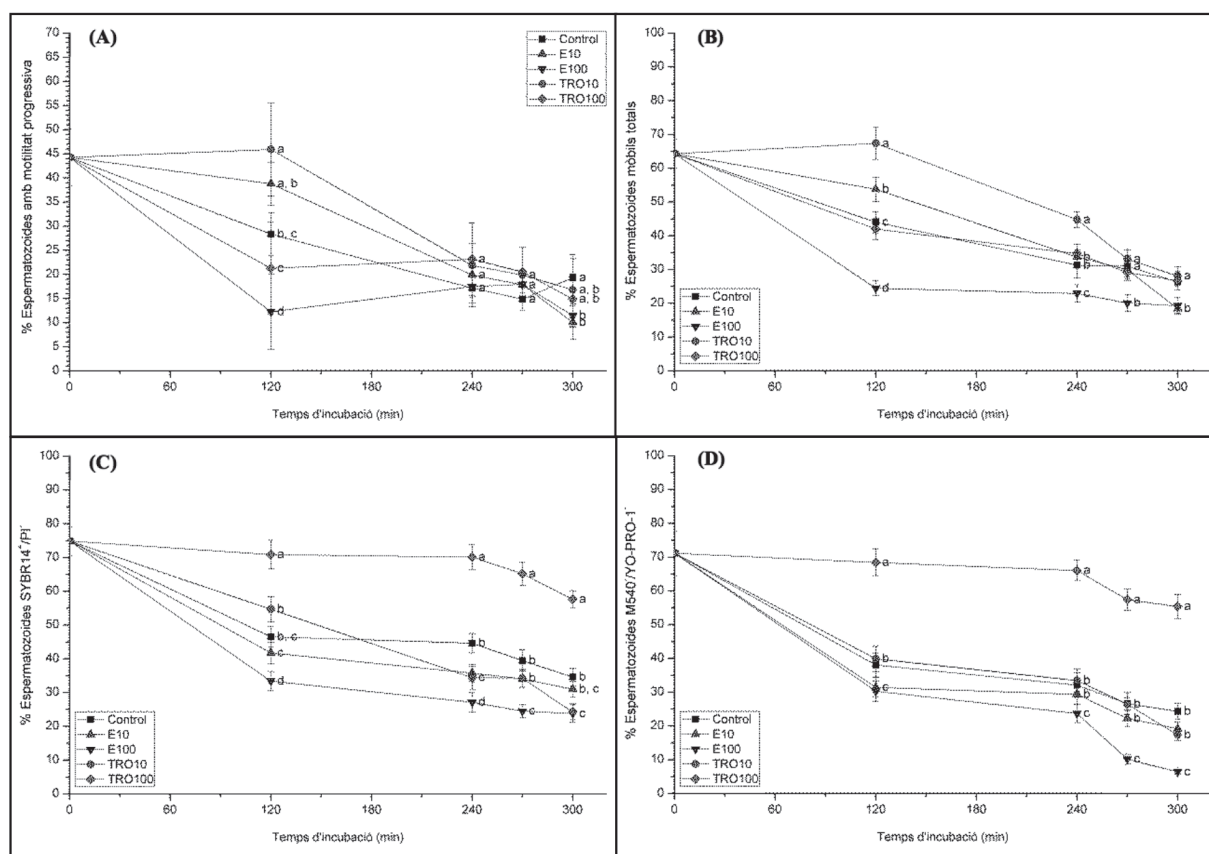


Figura 1. Comparació dels efectes dels dos inhibidors (erastin i olesoxime) en dues concentracions diferents (10 μ M i 100 μ M) respecte el control. Es representen la motilitat progressiva (A) i total (B), la viabilitat (C) i el desordre lipídic (D) de la membrana plasmàtica. En tots els casos, es representa la mitjana i l'error estàndard de la mitjana. Les diferències significatives entre tractaments ($p \leq 0,05$) dins d'un mateix temps es denoten amb superíndexs diferents (*a*, *b*, *c*). Abreviacions: E10: erastin 10 μ M; E100: erastin 100 μ M; TRO10: olesoxime 10 μ M; TRO100: olesoxime 100 μ M.

(M540⁺). Tanmateix, aquesta reducció no es va observar en el tractament d'olesoxime 100 μ M, atès que el percentatge d'espermatozoides amb baix desordre lipídic a la seva membrana va ser significativament superior a la resta de tractaments des dels 120 min i fins al final de l'experiment. En canvi, la presència d'erastina a elevades concentracions va reduir aquest paràmetre de manera significativa respecte el control a partir dels 120 min d'incubació. Per contra, les concentracions més baixes d'ambdós inhibidors (10 μ M) no van tenir un impacte significatiu sobre el percentatge d'espermatozoides amb baix desordre lipídic.

DISCUSSIÓ

Aquest estudi ha pretès incrementar el coneixement del paper que els canals iònics tradicionalment menys estudiats, com la VDAC2, tenen durant la capacitació esper-

màtica. Per aquest motiu s'ha assajat l'addició de dos inhibidors diferents (l'erastina i l'olesoxime) a dues concentracions diferents (10 μ M i 100 μ M) i s'han determinat els seus efectes sobre diferents paràmetres indicadors de la capacitació espermàtica, tant abans com després de l'addició de la progesterona.

Per una banda, l'anàlisi de la motilitat indica que tant la motilitat progressiva com la total tendeixen a disminuir amb concentracions de 100 μ M d'erastina i d'olesoxime. En canvi, els efectes sobre ambdós paràmetres són molt menys evidents quan les concentracions són d'un ordre de magnitud inferior.

D'altra banda, tant l'anàlisi de la viabilitat espermàtica com el de la viabilitat indiquen que una concentració elevada d'olesoxime (100 μ M) inhibeix la capacitació espermàtica, àdhuc quan l'espermatozoide es troba en un medi capacitant i en presència de bicarbonat i BSA. Aquest efecte inhibitor tant de la capacitació espermàtica suggereix que la VDAC2 té un paper molt

important durant aquest fenomen fisiològicament tant rellevant per la vida d'un espermatozoide i pel desenvolupament de la seva capacitat fecundant. Aquest resultat no hauria de ser sorprenent, atès que aquest canal de membrana mitocondrial està implicat en el trànsit del calci, i estudis previs han demostrat que el calci mitocondrial juga un paper fonamental per la motilitat espermàtica i durant la capacitació (Costello et al., 2009; Yeste et al., 2015).

Tanmateix, els resultats més interessants d'aquest treball provenen de la comparació dels efectes d'ambdós inhibidors. Malgrat els dos redueixen de manera significativa la motilitat espermàtica, especialment a les concentracions més elevades, els efectes sobre la fluïdesa o desordre lipídic de la membrana són completament oposats. Així, mentre l'increment del desordre lipídic característic de la capacitació s'observa també en presència d'erastina, el tractament amb olesoxime 100 µM inhibeix aquest increment, de manera que les cèl·lules espermàtiques mantenen la seva integritat i el seu estat no capacitat. Aquests resultats indiquen que, malgrat l'erastina i l'olesoxime inhibeixen la hiperactivació, és a dir, el canvi del patró de motilitat propi de la capacitació, els efectes sobre la fluïdesa de la membrana són diferents perquè actuen mitjançant mecanismes diferents. Una altra explicació seria que l'erastina no és un inhibidor prou específic, atès que desencadena un ruta, la ferroptosi que, fins avui, no s'ha descrit a l'espermatozoide (Yagoda et al., 2007). D'altra banda, l'olesoxime és un medicament neuroprotector de gran utilitat a l'esclerosi lateral amiotròfica (Bordet et al., 2010), de manera que calen altres estudis per avaluar els mecanismes que governen aquest efecte tant positiu observat sobre la integritat de la membrana espermàtica i la seva fluïdesa.

En resum, aquest estudi ha demostrat que la inhibició del canal VDAC2 a través de dos molècules dife-

rents té un efecte significatiu sobre la capacitació espermàtica. Tanmateix, es requereixen estudis addicionals per determinar les vies de senyalització cel·lular que es desencadenen en resposta a cadascun d'aquests inhibidors.

REFERÈNCIES

- Bordet T [et al] (2010) Olesoxime (TRO19622): A Novel Mitochondrial-Targeted Neuroprotective Compound. *Pharmaceuticals*, vol. 3, p. 345-368.
- Costello S [et al] (2009) Ca²⁺-stores in sperm: their identities and functions. *Reproduction*, vol. 138, p. 425-437.
- Kwon WS [et al] (2015) Proteomic approaches for profiling negative fertility markers in inferior boar spermatozoa. *Sci Rep*, vol. 5, p. 13821.
- Liu B [et al] (2010) Analysis and difference of voltage-dependent anion channel mRNA in ejaculated spermatozoa from normozoospermic fertile donors and infertile patients with idiopathic asthenozoospermia. *J Assist Reprod Genet*, vol. 27, p. 719-24.
- Vilagran I [et al] (2014) Relationship of sperm small heat-shock protein 10 and voltage dependent anion channel 2 with semen freezability in boars. *Theriogenology*, vol. 82, p. 418-426.
- Visconti PE (2009) Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *PNAS*, vol. 106, p. 667-668.
- Yagoda N [et al] (2007) RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage dependent anion channels. *Nature*, vol. 447, p. 864-868.
- Yeste M (2013) Boar spermatozoa within the oviductal environment (II): Sperm Capacitation. Dins: *Boar Reproduction*. Ed. Springer, Berlin, p. 281-342.

