

CAPÍTULO 10

Estudiando el espermatozoide,
de la ciencia básica a las técnicas
de reproducción asistida.

VIOLETA CALLE GUISADO

El grupo de investigación SINTREP (Señalización intracelular y Tecnología de la reproducción), al cual pertenezco desde enero de 2015, tiene una larga trayectoria en el estudio de la fisiología del espermatozoide y de la calidad seminal en diversas especies. Al tratarse de un grupo multidisciplinar, donde los investigadores principales pertenecen a distintas áreas del conocimiento (fisiología, bioquímica y reproducción), han conseguido aunar la investigación básica con la aplicación final de los resultados científicos obtenidos. Sus últimos trabajos se han centrado en la especie porcina, estudiando la célula germinal masculina, el espermatozoide, y la calidad de las dosis seminales porcinas, con el objetivo final de mejorar los procesos reproductivos en el cerdo ibérico y poder transferir estos conocimientos a una industria tan importante en Extremadura como es la producción de este animal para consumo.

Una de las líneas de investigación se centra en las dianas moleculares que detectan el estado de energía y regulan el metabolismo del espermatozoide de cerdo, lo que permite generar conocimiento acerca de la fisiología, bioquímica y biología molecular del mismo. Concretamente los estudios se centran en la proteína AMPK, quinasa activada por AMP. Esta proteína se identificó en los años 70 y es una molécula muy conservada desde el punto de vista evolutivo, que actúa como un sensor del estado energético celular y, de manera consecuente, regula el metabolismo (Hardie, Hawley y Scott, 2006). Detecta el estado energético celular al activarse alostéricamente por AMP, aunque también se activa por fosforilación en la Thr172 de su subunidad catalítica inducida por diversos estímulos dependiendo del tipo celular estudiado, como el calcio intracelular o varios tipos de estrés. La consecuencia metabólica de la actividad de la AMPK es la inducción de rutas catabólicas que producen ATP y la inhibición de rutas anabólicas que consumen ATP.

El espermatozoide de mamíferos necesita realizar una serie de procesos para lograr su función principal, que es la de fecundar al ovocito. Estos procesos incluyen la motilidad, la capacitación, la hiperactivación y la reacción acrosómica, y todos ellos son procesos dependientes de la energía de la célula. Por lo tanto, la hipótesis de partida era que esta importante proteína podría regular el metabolismo celular y, por tanto, los procesos funcionales más importantes, en los espermatozoides de mamíferos. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha identificado por primera vez la presencia de AMPK en el espermatozoide de mamíferos, donde actúa regulando procesos fisiológicos esenciales como la viabilidad, movilidad, potencial de membrana mitocondrial y la fluidez y organización de las membranas plasmática y acrosomal (Hurtado de Llera, Martín-Hidalgo, Gil, García-Marín y Bragado, 2012, 2014; Hurtado de Llera, Martín-Hidalgo, Rodríguez-Gil, Gil, García-Marín y Bragado, 2013). Paralelamente (Tartarin *et al.*, 2012), han confirmado el papel clave de la AMPK en la movilidad de espermatozoides de ratón.

Esta línea de investigación se ha continuado en la especie humana sirviendo de base para la realización de mi Tesis Doctoral. Nuestro trabajo actual cobra relevancia si tenemos en cuenta que en los últimos años ha habido un incremento notable del uso de las técnicas de reproducción asistida en los países desarrollados debido, mayoritariamente, a los cambios en los hábitos reproductivos y también debido al factor masculino, es decir, a un empeoramiento progresivo de la calidad seminal. En último término, nuestro objetivo es la transferencia de nuestros resultados y de las técnicas utilizadas al campo de la reproducción asistida. En relación a esta posible transferencia de resultados a la reproducción asistida en humanos se ha iniciado la colaboración con clínicas de reproducción asistida humana y con el grupo de reproducción del Centro de Cirugía de Mínima Invasión, lo que nos permite un contacto directo con los problemas actuales que se plantean dentro del campo de la reproducción asistida.

Más concretamente, con este proyecto pretendemos optimizar las técnicas de reproducción asistida, mediante la modificación del estado de actividad de la AMPK, que de lugar a un aumento del número de espermatozoides móviles y viables. Esta posible aplicación técnica de los resultados sería particularmente relevante en aquellos casos en que la motilidad de los espermatozoides está claramente comprometida, como es el caso de los varones que presentan infertilidad debida a la astenozoospermia, o baja movilidad de los espermatozoides del eyaculado, que implica una baja prognosis de la fertilidad.

Por ello nos planteamos una serie de objetivos concretos a alcanzar como son estudiar la expresión y localización celular de la proteína quinasa AMPK y las vías de señalización que regulan su actividad enzimática en espermatozoides humanos, analizar el efecto de un incremento en la actividad de la AMPK en los principales procesos funcionales del espermatozoide humano y por último, aplicar a la mejora de la calidad seminal de los conocimientos científicos alcanzados en los objetivos anteriores.

Para llevar a cabo los objetivos propuestos, en nuestro laboratorio disponemos de distintas técnicas experimentales como, entre otras: a) análisis de proteínas en lisados de espermatozoides humanos; b) localización celular de proteínas mediante inmunofluorescencia; c) determinación de la movilidad espermática mediante CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*); d) determinación de diferentes parámetros como la estabilidad de la membrana plasmática y acrosomal, la viabilidad celular, entre otros, por citometría de flujo.

El análisis de la motilidad del espermatozoide mediante el programa informático ISAS permite evaluar de una manera totalmente objetiva la velocidad y calidad del movimiento de los espermatozoides de una muestra de semen. Mediante el estudio digitalizado y el análisis computerizado del movimiento del espermatozoide se obtiene una aproximación objetiva a las características de la movilidad de estas células germinales. Por otra parte, en nuestro grupo de investigación disponemos de un citómetro de flujo y una gran experiencia en su manejo, lo que nos permite analizar los procesos funcionales de los espermatozoides optimizando los protocolos desarrollados y comprobados en otros laboratorios. El uso de la citometría de flujo

está introduciéndose con fuerza en los últimos años en los laboratorios de espermología debido principalmente al elevado número de aplicaciones derivadas de esta técnica, su facilidad de utilización con estas células germinales y el alto número de células analizadas en muy poco tiempo, lo que hace aumentar significativamente la fiabilidad de los análisis.

El desarrollo de mi trabajo en el laboratorio me ha permitido obtener resultados preliminares esperanzadores por lo que espero poder continuar con este camino y conseguir los objetivos marcados. Sobre todo el objetivo fundamental de toda investigación, el de generar nuevo conocimiento y finalmente aportar mejoras a la sociedad mediante la aplicación de este.

REFERENCIAS

- Hardie, D. G.; Hawley, S. A. y Scott, J. W. (2006). AMP-activated protein kinase - development of the energy sensor concept. *Journal of Physiology*, 574, 7-15.
- Hurtado de Llera, A.; Martín-Hidalgo, D.; Gil, M. C.; García-Marín, L. J. y Bragado, M. J. (2012). AMP-Activated Kinase AMPK Is Expressed in Boar Spermatozoa and Regulates Motility. *PLoS ONE*, 7(6), e38840. doi: 10.1371/journal.pone.0038840
- Hurtado de Llera, A.; Martín-Hidalgo, D.; Gil, M. C.; García-Marín, L. J. y Bragado, M. J. (2014). The calcium/CaMKK α / β and the cAMP/PKA pathways are essential upstream regulators of AMPK activity in boar spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 90(2), 1-10.
- Hurtado de Llera, A.; Martín-Hidalgo, D.; Rodríguez-Gil, J. E.; Gil, M. C.; García-Marín, L. J. y Bragado, M. J. (2013). AMP-activated kinase, AMPK, is involved in the maintenance of plasma membrane organization in boar spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828(9), 2143-2151.
- Tartarin, P.; Guibert, E.; Touré, A.; Ouiste, C.; Leclerc, J.; Sanz, N.; Brière, S.; Dacheux, J. L.; Delaleu, B.; McNeilly, J. R.; McNeilly, A. S.; Brillard, J. P.; Dupont, J.; Foretz, M.; Viollet, B. y Froment, P. (2012). Inactivation of AMPK α 1 induces asthenozoospermia and alters spermatozoa morphology. *Endocrinology*, 153(7), 3468-3481. doi: 10.1210/en.2011-1911

APUNTES BIOGRÁFICOS

Violeta Calle Guisado (Cáceres, 24 de agosto de 1989) es Licenciada en Biología por la Universidad de Extremadura y de Granada. Además realizó el Máster de Investigación en Ciencias y el Máster de Formación del Profesorado en Educación Secundaria, especialidad Biología y es Especialista Universitaria en Reproducción Asistida. Desde 2015 reside en Cáceres, donde tiene una Beca de Formación del Profesorado Universitario (FPU) para la realización de la Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética de la Facultad de Veterinaria.

Contacto: violetacalleguisado@gmail.com