Gaceta de Ciencias Veterinarias Vol 12 N° 2 pp 61-66 2007

Relación entre la densidad de receptores para el Gm-Csf en espermatozoides bovinos y la fertilidad real.

Relationship between Gm-Csf receptor density and fertility in brahman bulls

[1] **Vilanova, L. y Ballarales P.**
[1] Departamento de Genética y Reproducción Animal
Decanato de Ciencias Veterinarias. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado".
Barquisimeto. Venezuela. E-mail: ltvilanova@ucla.edu.ve

Recibido: 25-06-06 Aceptado: 18-09-06

RESUMEN

El Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF) es una citoquina con múltiples funciones celulares. Su receptor es una glicoproteina compuesta por dos subunidades, α y β, involucrada en la captación de glucosa por los espermatozoides. La subunidad α se localiza en el acrosoma y en el flagelo; y la subunidad β en el flagelo. Se ha demostrado una variación en la densidad de ambas subunidades sobre la superficie espermática y una relación significativa con el movimiento espermático. El objetivo de la presente investigación fue demostrar la relación entre la densidad de las dos subunidades sobre la superficie de espermatozoides de toros Brahman y su fertilidad medida en el porcentaje de preñez al primer servicio. Para ello se realizó inmunocitoquímica en esparcidos espermáticos de 7 toros Brahman (2 y 3 años, con porcentajes de preñez del 76 al 100%), utilizando anticuerpos policlonales contra las subunidades y del receptor. El estudio de la densidad del receptor se realizó sobre 10 esparcidos/toro de espermatozoides inmunoteñidos captados por un analizador de imágenes (UNI SCAN IT). Los datos fueron analizados con SAS a través de coeficientes de correlaciones Pearson. La inmunocitoquímica corroboró la colocalización flagelar de ambas subunidades y una localización aislada de la subunidad en el acrosoma. Se encontró una correlación entre fertilidad y la densidad de la subunidad α de 0,48661 ($p<0,05$); mientras que para la subunidad β la correlación fue de - 0,03775 ($p>0,05$). Quizás la alta densidad de la unidad α aumente la captación de glucosa en los espermatozoides y, por lo tanto, la capacidad y calidad del movimiento espermático sea superior en los toros de mayor fertilidad. Estos resultados sugieren que la determinación de la densidad de la subunidad podría ser un buen indicador de la fertilidad de los toros.

Palabras clave: GM-CSF, espermatozoides, fertilidad

ABSTRACT

The granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) is a pleiotropic cytokine. Its receptor is a glycoprotein composed by two subunits, α and β, involved in glucose and vitamin C uptake by spermatozoa. The α subunit localizes on both sperm acrosoma and tail, whereas the β subunit only on the tail. It has been demonstrated a variation of the density of both subunits on the sperm surface, and a significant relationship with sperm motility. The objective of this work was to demonstrate the relationship between the densities of both subunits on the sperm surface and the fertility of Brahman bulls as pregnancy rate at first service. Semen samples from 7 Brahman bulls, 2-3 years old, and pregnancy rates 76-100% were tested through immunocytochemistry using polyclonal antibodies against α and β subunits. Images from immunostained spermatozoa were captured and analyzed by the software UNI-SCAN-IT® (USA) to determine receptor density. Data obtained from this study was analyzed by SAS® (USA) using the Pearson's correlation coefficient. It was confirmed that both subunits co-localize on the sperm tail surface, while α subunit was also found on the sperm acrosome. Correlation coefficient between fertility and the α subunit density was 0.48661 ($p<0.05$), whereas it was -0.03775 ($p>0.05$) for the β subunit. It is possible that the higher densities of the α subunit in the most fertile bulls are responsible for an elevated glucose uptake by the spermatozoa, thus raising its ability to displace and enhancing the quality of that movement. These results suggest that the density of the GM-CSF receptor α subunit could be a good predictor for bull fertility.

Key Words: GM-CSF, sperm, fertility

INTRODUCCIÓN

El Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF) es una glicoproteína regulatoria perteneciente al diverso grupo de los factores de crecimiento y del cual se han determinado múltiples funciones.

El GM-CSF es una citoquina pleiotrópica con dos pares de hélices antiparalelas, y dos puentes disulfuros intramoleculares altamente conservados y esenciales para realizar el correcto plegamiento proteico y llevar a cabo la actividad biológica [1]. El receptor para esta citoquina es una glicoproteína compuesta por dos subunidades: α y β [2]. La subunidad del receptor (subunidad α de unión del ligando) para el factor humano es producida como un precursor de 400 aminoácidos (aa), tiene un segmento transmembrana de 26 aa, un dominio extracelular de 298 aa y un dominio citoplasmático corto de 54 aa. Los 200 aa proximales por el lado extracelular a la región transmembrana forman un dominio que probablemente une al factor, el cual es homólogo en varios receptores de citoquinas.

La subunidad α se une al GM-CSF con baja afinidad, mientras que la subunidad β, con 897 aa (secuencia líder de 16 aa, dominio transmembrana de 27 aa y cola citoplasmática de 350 aa), no une GM-CSF por si sola, sino que interactúa físicamente con la subunidad α y forman un receptor de alta afinidad.

El receptor para el GM-CSF comparte la subunidad β (subunidad de transducción) con los receptores de interleuquina 3 e interleuquina 5, denominándose subunidad β común (c) [3,4] siendo específica la subunidad de cada citoquina.

Los receptores para el GM-CSF han sido encontrados también en células no hematopoyéticas con células germinales masculinas y en espermatozoides bovinos [5,1] sin que se conozca su papel fisiológico en estas células.

Se ha determinado que las células de Sertoli y Leydig producen una gran variedad de citoquinas [6] que estarían involucradas en mecanismos autocrinos y/o paracrinos regulando la función testicular y, tal vez, la capacidad fecundante de los espermatozoides. Sin embargo, las relaciones encontradas entre las distintas citoquinas del plasma seminal y los parámetros seminales difieren según sea la citoquina involucrada.

La ubicación del receptor a lo largo de la pieza intermedia y de la cola del espermatozoide bovino y humano [1] sugiere que el GM-CSF podría estar involucrado en el metabolismo espermático ya que las mitocondrias de la pieza intermedia representan la mayor fuente de energía celular. Se ha determinado que la adición de 2 nM del factor en presencia de 5 mM de glucosa y 16 mM de fructosa a espermatozoides bovinos, aumenta el movimiento espermático probablemente por un aumento del transporte de hexosas [7].

El factor es secretado por las células germinales de bovino, y posiblemente controlen de alguna manera la espermatogénesis. Ha sido demostrado que el GM-CSF estimula la captación de glucosa y vitamina C a través de los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs), los cuales componen una familia de proteínas que pueden tener una actividad transportadora multifuncional, transportando glucosa, fructosa y vitamina C [8, 9, 1]. Estudios realizados por varios investigadores han demostrado la presencia de GLUT1, GLUT2, GLUT3 y GLUT5 en la cabeza y cola de espermatozoides de humano, bovino y rata, comprobando su participación directa en el transporte de glucosa, fructosa y la forma oxidada de la vitamina C (ácido deshidroascórbico) [10, 9].

Es de especial interés que el GLUT3 posea gran afinidad por la glucosa y el GLUT5 por la fructosa [9] y que la ubicación celular de ambos transportadores (a nivel de la pieza intermedia y cola de espermatozoides bovinos, humanos y de rata) coincida con la ubicación del receptor para GM-CSF ya que la densidad del receptor y la capacidad de los transportadores podrían reflejar la calidad del movimiento espermático.

Los espermatozoides pueden usar la fructosa y la glucosa como una fuente externa de energía, indicando que estas células poseen un eficiente transporte para tomar los azúcares extracelulares [11]. Teniendo en cuenta que la fructosa encontrada en el plasma seminal es la fuente principal de energía para los espermatozoides, así como el ácido láctico y el ácido pirúvico originados por la glucólisis en presencia de oxígeno, es de esperar que el transporte facilitativo de estas hexosas por los GLUTs, y su interacción con el receptor para GM-CSF se relacionen con la calidad del movimiento espermático y, en consecuencia, con la capacidad fecundante del semen bovino.

Antes de utilizar un toro en programas de inseminación artificial es importante conocer su fertilidad, ya que su capacidad fecundante no sólo repercutirá en el número de crías nacidas sino también en la fertilidad de su descendencia. No sólo es importante conocer si ese animal es capaz de dejar descendencia sino conocer el nivel de fertilidad que posee. Aunque se han propuesto muchos y variados métodos de evaluación seminal como predictores de la fertilidad de los toros, la aplicación de una única prueba de evaluación seminal no siempre es suficiente. Por ello, existe una búsqueda continua de alguna prueba seminal o combinación de varias de ellas que permita

predecir la fertilidad con mayor exactitud y a costos más bajos. Es por estas razones que el estudio de densidad del receptor GM-CSF sobre la superficie espermática y su posible relación con la capacidad fecundante se traduzca en una herramienta que permita predecir la fertilidad real de los toros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con 7 toros de raza Brahman con edades comprendidas entre los 2 y 4 años de edad y distintos niveles de fertilidad real (siendo los extremos en porcentaje preñez al primer servicio el 100 y el 76%). De cada uno de los toros se procesaron diez dosis de semen para la cuantificación de la densidad de receptores sobre extendidos espermáticos.

Inmunocitoquímica en esparcidos de espermatozoides

Una vez descongelado el semen, se centrifugó a 1500 g por 10 minutos en PBS (se repitió el lavado tres veces). Sobre portaobjetos previamente cubiertos con una solución de gelatina de piel de bovino al 5%, sulfato de cromo III y potasio al 0,05%, se colocaron de 2 a 5l de la solución de espermatozoides y se fijaron con Histochoice en etanol (4:1) por 10 minutos. Posteriormente, se incubaron en cámara húmeda por 3 minutos con peróxido de hidrógeno (H202) al 1% y luego se lavaron con PBS, procediendo inmediatamente a bloquear cada muestra con una solución conteniendo leche descremada 5%, BSA 1%, Tritón X-100 0,3% en PBS incubando durante 1 hora a temperatura ambiente en las cámaras húmedas. Luego, las muestras se cubrieron con 100 l de una dilución 1:100 (en solución de bloqueo) de los anticuerpos contra las subunidades α y β del receptor del GM-CSF humano (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), incubándose toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Se utilizó DAKO® Quick Staining Kit HRP para el revelado. Finalmente las muestras se colorearon en una solución de hematoxilina, se deshidrataron en etanol al 80 y 100% por 5 segundos en cada solución y se sumergieron en xilol por 5 a 10 minutos.

Determinación de la densidad de receptores sobre la superficie espermática

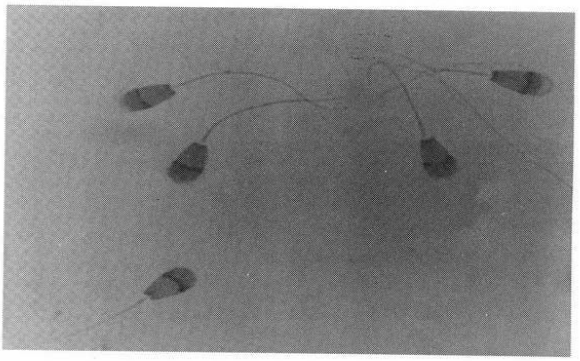
Las imágenes de los espermatozoides inmunoteñidos se captaron a través de un microscopio y se analizaron con analizador de imágenes (IMAGE PRO PLUS), el cual mide la densidad de un determinado color (en este caso el color pardo dado por la peroxidasa) en unidades de píxeles. El trabajo se realizó sobre 10 esparcidos de espermatozoides obtenidos de cada toro, en los que se midió separadamente cada subunidad del receptor, contabilizando los espermatozoides de 10 campos ópticos por esparcido espermático.

Los datos obtenidos se analizaron con una Matriz de Correlaciones de Pearson, para obtener el grado de asociatividad entre la densidad de receptores para cada subunidad y la fertilidad de los toros (programa estadístico SpSS 10.0).

RESULTADOS

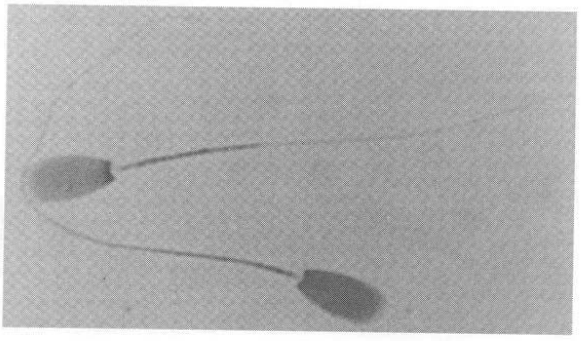
Se determinó la inmunolocalización de las subunidades α y β de receptor GM-CSF en espermatozoides eyaculados de 7 toros, localizándose la subunidadα invariablemente en el acrosoma y la cola espermática (Figura 1), evidenciándose variabilidad en la intensidad de la inmunoreacción entre los distintos eyaculados usados siendo esto más notable en el acrosoma. Con respecto a la subunidad β, se pudo corroborar que su ubicación se restringe a la cola espermática (Figura 2).

Figura 1. Inmunolocalización de la subunidad α del receptor del gm-csf en espermatozoides eyaculados.



Se puede apreciar la inmunolocalización de la subunidad en el acrosoma y cola de los espermatozoides.

Figura 2. Inmunolocalización de la subunidad β del receptor del gm-csf en espermatozoides eyaculados. Se muestra la inmunolocalización de la subunidad β en la cola de los espermatozoides.



En las Tablas I y II se puede apreciar la estadística descriptiva de ambas subunidades ubicadas en espermatozoides bovinos.

Tabla I. Estadística descriptiva de la subunidad alfa del receptor GM-CSF en espermatozoides bovinos.

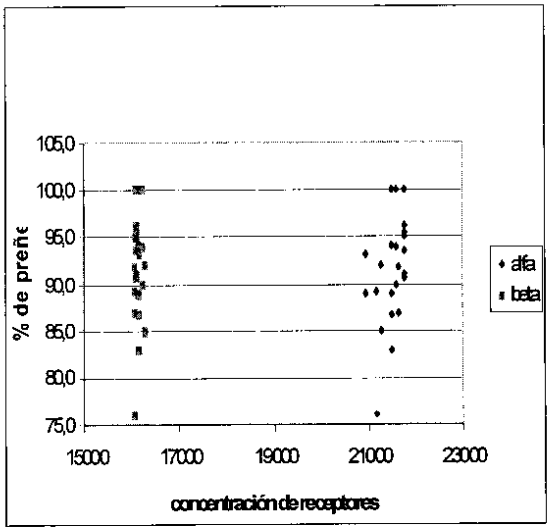
Toro	Media	DS	CV	mediana	Val min	Val max
1	**21274,6**	1439,2	6,8	21162,0	19757,0	23734
2	**21651,8**	1650,4	7,6	22042,5	19281,0	23872
3	**21604,2**	1650,1	7,6	21648,5	19212,0	23796
4	**21505,6**	1116,0	5,2	21527,5	19513,0	23425
5	**21789,5**	1343,7	6,2	22271,5	19346,0	23451
6	**21179,0**	1120,6	5,3	20850,5	19512,0	23303
7	**20952,3**	1441,7	6,9	20897,0	19109,0	23759

DS: desviación estándar CV: coeficiente de variación
Val min: valores mínimos Val max: valores máximos

La Matriz de Correlaciones de Pearson demostró una correlación entre fertilidad y la densidad de la subunidad α de 0.48661 ($p<0.05$); mientras que para la subunidad β la correlación fue de - 0,03775 ($p>0,05$).

En la Figura 3 se puede observar la relación entre el porcentaje de preñez de los toros utilizados en esta investigación y la densidad de las subunidades α y β del receptor GM-CSF ubicado por inmunocitoquímica.

Tabla II. Estadística descriptiva de la subunidad beta del receptor GM-CSF en espermatozoides bovinos



DISCUSION

La inmunocitoquímica realizada en espermatozoides eyaculados llevada a cabo en esta investigación, mostró que ambas subunidades se colocalizan en la cola del espermatozoide (Fig. 1 y 2) y, también determinó, una localización aislada de la subunidad en el acrosoma del espermatozoide (Fig.1). Si bien es cierto que, en los modelos celulares hasta ahora estudiados, la subunidad α es la responsable de unir al ligando y la subunidad β es la unidad de transducción, y juntas conforman un receptor heterodimérico de alta afinidad, la ubicación aislada de la subunidad α en ausencia de la subunidad β en el acrosoma de los espermatozoides podría sugerir un papel hasta ahora no definido para esta subunidad en este tipo celular.

Con respecto a la densidad de ambas subunidades, se encontró que la densidad de la subunidad β está siempre por debajo de la densidad encontrada para la subunidad α (Tablas I y II). Estos datos corroboran de manera cuantitativa, los hallazgos cualitativos encontrados por inmunocitoquímica [7] la cual reveló una sobreexpresión de la subunidad α con respecto a la subunidad β. Se ha establecido que la subunidad del receptor es común para otras interleuquinas (IL-3 y IL-5) [3, 4] y por lo tanto, sería lógico encontrar una densidad mayor de esta subunidad en la superficie plasmática de las células blanco del GM-CSF. Sin embargo, en esta investigación se encontró una mayor densidad de la subunidad α con respecto a la subunidad β en los espermatozoides situación que podría sugerir en estas células un mecanismo distinto de acción de la subunidad α en ausencia de su contraparte, la subunidad β.

El GM-CSF media sus efectos a través de su interacción con su receptor ubicado en la membrana plasmática, en la cual la subunidad α aislada se une al factor con baja afinidad (Kd de 1-7 nM) y la subunidad β, que es fosforilable, no es capaz de unir al factor por si sola. Sin embargo, al unirse a la subunidad α se forma un receptor de alta afinidad (Kd 20-100 pM). Se ha reportado en investigaciones sobre ensayos de unión del GM-CSF, que los espermatozoides bovinos eyaculados expresan aproximadamente 105 sitios de unión de alta afinidad para este factor de crecimiento con una Kd de 222 pM, y 1100 sitios de unión baja afinidad con una Kd de 10 nM [1]. Estos resultados estarían indicando la presencia de un exceso de la subunidad α comparado con la subunidad β, hallazgo que respaldaría lo encontrado en esta investigación y lo reportado en espermatozoides epididimarios [7] en los que se encontró una mayor densidad de receptores para la subunidad α en comparación con la subunidad β

En esta investigación se encontró una correlación entre la fertilidad de los toros y la densidad de la subunidad α de 0.48661 (p<0.05); mientras que para la subunidad β la correlación fue de - 0,03775 (p>0,05). Quizás la alta densidad de la unidad α aumente la captación de glucosa en los espermatozoides y, por lo tanto, la capacidad y calidad del movimiento espermático sea superior en los toros de mayor fertilidad.

Si se toman en cuentan algunos datos de la literatura que indican que los espermatozoides son altamente dependientes de la concentración de glucosa, fructosa y lactato [11], que además estas células expresan el receptor GM-CSF, GLUT3 y GLUT5 [9,12] y que el GM-CSF aumenta el transporte de glucosa y fructosa a través de los GLUTs [1], es probable que estas proteínas de membrana en estas células sean parte de su maquinaria energética y estén involucradas en el metabolismo celular.

Al analizar en conjuntos todos estos hallazgos se establece que la mayor densidad de receptores de GM-CSF en los espermatozoides de los toros con mayor fertilidad, podría influenciar de manera directa una mejor utilización de los sustratos energéticos mediante su transporte facilitativo través de los GLUTs, aumentando el metabolismo espermático, situación que le permitiría a los espermatozoides obtener una mejor utilización del GM-CSF redundando en un mejor patrón de movimiento.

En las últimas décadas ha crecido mucho el interés por parte de la industria de la inseminación artificial en la medición de la calidad y la capacidad fecundante del semen bovino. Aunque se han propuesto muchos y variados métodos de evaluación seminal como predictores de la fertilidad potencial de los toros, la aplicación de una única prueba de evaluación seminal no siempre es suficiente. Por ello, existe una búsqueda continua de alguna prueba seminal o combinación de varias de ellas que permita predecir la fertilidad con mayor exactitud y a costos más bajos. Estos resultados sugieren que la determinación de la densidad de la subunidad podría ser un buen indicador de la fertilidad de los toros.

CONCLUSIONES

El estudio de densidad de receptores del GM-CSF indicó que los espermatozoides eyaculados tienen una mayor densidad de la subunidad α en la superficie espermática en relación con la subunidad β.

La subunidad α se inmunolocalizó en el acrosoma y cola de los espermatozoides, mientras de la subunidad β se restringió en la cola de los espermatozoides. Se encontró que la densidad de la subunidadα fue mayor que la densidad de la subunidad β.

Se encontró una correlación entre la densidad de la subunidad α del receptor del GM-CSF y la fertilidad de los toros (p<0.05) sugiriendo que la determinación de la densidad de esta subunidad podría ser un buen indicador de la fertilidad de los toros.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al C.D.C.H.T de la UCLA por el financiamiento prestado al Proyecto 018-VE-2004 sin el cual esta investigación no hubiese sido posible.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Zambrano, A., Noli C.,. Rauch M, Werner E., Brito M.,. Amthauer R,. Slebe J.C,. Vera J.C, Concha I.I. Expression of GM-CSF receptors in male germ cells and their role in signaling for increased glucose and vitamin C transport. J Cell Biochem 2001; 80: 625-634.

[2] Hayashida, K., Kitamura T.,. Gorman D., Arai K., Yokota T., Miyajima A. Molecular cloning of a second subunit of the receptor for human granulocyte- macrophage colony stimulating factor (GM-CSF): Reconstitution of a high-affinity GM-CSF receptor. Proc Natl Acad Sci 1990; 87: 9655-9659.

[3] Kitamura, T., Sato N., Arai K., Miyajima A. Expression cloning of the human IL-3 receptor cDNA reveals a shared beta subunit for the human IL-3 and GM-CSF receptors. Cell 2001; 66: 1165-1171.

[4] Weiss, M., Yokoyama C., Shikama Y., Naugle C., Druker B., Sieff C. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor signal transduction requires the proximal cytoplasmic domains of the and subunits. Blood 2001; 82: 3298-3306.

[5] Noli, C. Receptor del factor de estimulación granulocito-macrófago (GM-CSF) en células de la línea germinal masculina. Tesis Bioquímica. Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile. 1999.

[6] Hecht, N. Gene expression during spermiogenesis. En: Thibault, C., M-C. Levasseur, R.H.F. Hunter (Eds.) Reproduction in Mammals and Man. Ellipses. Paris. 1990; .pp. 227-255.

[7] Vilanova L T., Rauch C., Zambrano A., Brito M., Werner E., Concha Ii. Caracterización funcional y localización del receptor GM-CSF en espermatozoides bovinos. Archivos de Medicina Veterinaria 2003; XXXV, N°2.

[8] Concha, I.I., Velásquez F., Martínez J., Angulo C., Droppelmann A, Reyes A., Slebe J.C., Vera J.C., Golde D.W. Human erytrocytes express GLUT5 and transport fructosa. Blood 2001; 89: 4190-4195.

[9] Angulo, C., Rauch M., Droppelmann A., Reyes A., Slebe J.C., Delgado-López F., Guaiquil V., Vera J.C., Concha I.I.. Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa. Celular localization and transport of hexoses and vitamin C.J. Cell Biochem 2002; 71: 189-203.

[10] Rauch, M., Reyes J., Concha I.I. Expression of hexose transporters GLUT 1 and GLUT 3 in isolated male germ cells. Eur J Biochem 2005; 268:272

[11] Grootegoed, J., Den Boer P. Energy metabolism of spermatids: a review. Cellular and molecular events in spermiogenesis. Cambridge University Press 2000; pp 193-216.