

VALORACIÓN DEL DAÑO EN EL DNA MEDIANTE TUNEL EN MUESTRAS CAPACITADAS DE ESPERMA OVINO

Pérez-Pé, R., Colás, C., Mendoza, N., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A.
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Veterinaria.
Universidad de Zaragoza.

INTRODUCCIÓN

Para que el espermatozoide de mamíferos adquiera capacidad fecundante ha de sufrir una serie de procesos bioquímicos, conocidos como capacitación, que le posibilitará llevar a cabo la reacción acrosómica y la fertilización del ovocito (Yanagimachi, 1994). Varios autores han observado ciertas características en el espermatozoide habitualmente relacionadas con el fenómeno de apoptosis en células somáticas (Weng *et al.*, 2002). Pero existe bastante controversia en cuanto a la relación entre la capacitación espermática y los marcadores apoptóticos (Gadella *et al.*, 2002). Uno de estos marcadores apoptóticos es la fragmentación del DNA. Para aclarar esta cuestión en el espermatozoide ovino, en el presente trabajo se estudió el daño en el DNA (mediante la técnica de TUNEL) en muestras incubadas en condiciones capacitantes (5% CO₂, 39 °C), en ausencia y presencia de determinados aditivos. Se evaluó el estado de capacitación, la integridad de membrana y distintos parámetros de motilidad en cada una de las muestras a lo largo del tiempo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la obtención del semen, mediante vagina artificial, se emplearon moruecos adultos de entre 2 y 4 años, pertenecientes a la Asociación Nacional de Criadores de Ganado selecto de la raza Rasa Aragonesa pertenecientes a ANGRA, estabulados en la Facultad de Veterinaria.

La separación del plasma seminal se realizó por un método de swim-up/dextrano (García-López *et al.*, 1996) en un medio compuesto por NaCl 100 mM, KCl 3,1 mM, 2 mM, NaH₂PO₄ 0,3 mM, MgCl₂·6H₂O 0,4 mM, HEPES 10 mM, piruvato sódico 1 mM, lactato sódico 21,6 mM, glucosa 5 mM y sacarosa 200 mM. Las células obtenidas se dividieron en 3 alícuotas que se incubaron en estufa con 5% CO₂ a 39 °C. Al primer tipo de muestras no se les añadió nada (SWIM-UP); a las segundas se les adicionaron NaHCO₃ 25 mM, CaCl₂·2H₂O 3 mM y BSA 5 mg/ml como agentes capacitantes (CONTROL); y al tercer tipo de muestras se añadieron además una mezcla de aditivos (metil-b-ciclodextrinas 2,5 mM, teofilina 1 mM, cafeína 1 mM, ácido okadaico 0,2 µM, db-cAMP 1 mM) para evaluar su efecto sobre la capacitación (ADITIVOS).

La valoración del estado de capacitación se llevó a cabo mediante la tinción con clorotetraciclina (CTC) (Pérez-Pé *et al.*, 2002). La motilidad espermática se valoró utilizando un Sistema Computerizado de Análisis Seminal (PROISER) y la viabilidad mediante la doble tinción de fluorescencia con CFDA y PI (Harrison y Vickers, 1990). El daño en el DNA se estudió mediante la técnica de "TUNEL" (Terminal deoxynucleotidyl Transferase mediated-dUTP Nick End Labelling) (Li y Darzynkiewicz, 1995) usando el kit "In situ cell death detection kit, fluorescein", de Roche y siguiendo las especificaciones del fabricante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 refleja el efecto de la mezcla de aditivos sobre la capacitación espermática. Este efecto consistió en un aumento en el porcentaje de espermatozoides capacitados inmediatamente después de su adición (29,0% vs. 42,3%). Esta diferencia fue aumentando a lo largo de todo el tiempo de incubación, si bien las diferencias significativas se observaron al comparar la suma de espermatozoides capacitados y reaccionados entre las muestras control y en presencia de aditivos a partir de la hora de incubación. Al cabo de 4 horas, esta suma fue de 67,34% en muestras control y de 97,67% en presencia de aditivos (P<0,01).

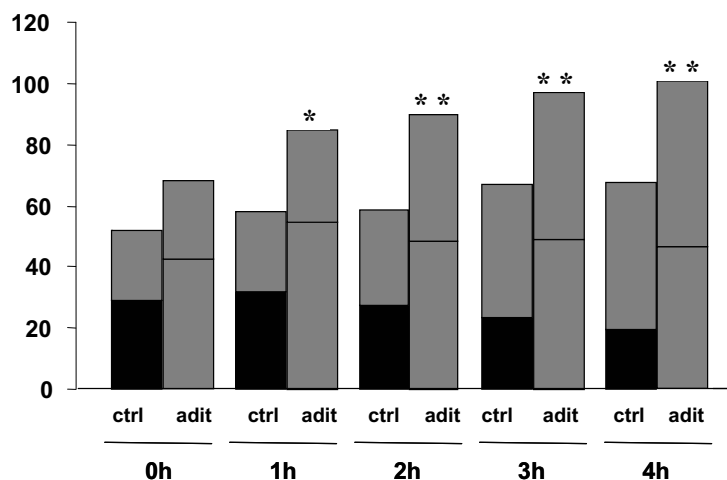


Fig. 1.- Valoración con CTC del estado de capacitación de espermatozoides ovinos. Muestras control (ctrl.: swim-up con adición de 4 mM calcio y 25 mM bicarbonato), y en presencia de aditivos (adit), a lo largo del tiempo de incubación con 5% CO₂ a 39°C. (■) y (▒): % de espermatozoides capacitados; (▒) y (□): % de espermatozoides reaccionados acrosómicamente. (n= 4). Los * indican diferencias significativas con respecto al control a la misma hora: *P<0,05, ** P<0,01.

El aumento del daño en el DNA en muestras capacitadas (Fig. 2) no parece deberse solamente al efecto del tiempo de incubación en estufa (5% CO₂ ,39 °C), ya que las muestras incubadas en ausencia de agentes capacitantes (swim-up) presentaron un menor porcentaje de espermatozoides Tunel-positivos que las capacitadas, tanto control como en presencia de aditivos (30,0% vs. 41,4 y 39,4% respectivamente), aunque estas diferencias no fueron significativas.

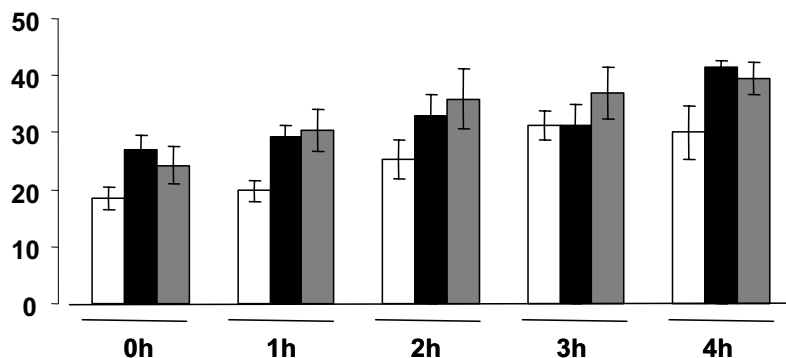


Fig. 2.- Valoración del daño a nivel del DNA mediante la técnica de Tunel en espermatozoides ovinos. Muestras swim-up (□), control (swim-up con adición de 4 mM calcio y 25 mM bicarbonato) (■), y en presencia de aditivos (▒), a lo largo del tiempo de incubación con 5% CO₂ a 39°C. Valores medios (% de espermatozoides positivos a Tunel ± SEM, n= 4).

Los cambios en los patrones de CTC no se corresponden con los cambios observados en la motilidad (Tabla 1). La mayoría de los parámetros analizados fueron disminuyendo progresivamente conforme aumentaba el tiempo de incubación en todas las muestras. La motilidad progresiva disminuyó más lentamente en las muestras control que en el resto. En cuanto a la viabilidad (integridad de membrana) descendió en torno a un 18% en muestras swim-up y un 25% en muestras capacitadas, aunque las diferencias no fueron significativas. Comparando el daño a nivel de membrana (células PI+) con el daño a nivel del DNA (células Tunel+), se encontró una correlación de 0,81 (r^2 , $P < 0,0001$), si bien el porcentaje de células con membrana dañada fue siempre mayor que el de células con DNA alterado, para cada tiempo de incubación.

Tabla 1.- Evolución de la motilidad progresiva y de la viabilidad a lo largo del tiempo de incubación en condiciones capacitantes en muestras swim-up, control y con aditivos.

Tº incubación	SWIM- UP		CONTROL		ADITIVOS	
	Mot. Progr.	Viabilidad	Mot. Progr.	Viabilidad	Mot. Progr.	Viabilidad
0 horas	48,52 ± 3,1 ^a	67,00 ± 4,4	38,45 ± 5,0	65,62 ± 4,4	38,12 ± 5,8 ^a	63,25 ± 7,1
1 horas	37,70 ± 3,8 ^a	65,62 ± 3,7	41,77 ± 3,4	57,87 ± 6,1	29,02 ± 5,2	57,87 ± 8,8
2 horas	30,80 ± 4,2	65,50 ± 1,7	33,66 ± 7,9	56,50 ± 2,5	21,10 ± 7,8	56,25 ± 6,4
3 horas	21,76 ± 2,9	63,00 ± 2,5	26,46 ± 7,3	45,33 ± 4,3	11,43 ± 4,6	52,33 ± 7,3
4 horas	8,13 ± 1,3 ^b	54,75 ± 5,5	20,60 ± 8,2	48,75 ± 3,8	8,86 ± 2,8 ^b	46,50 ± 1,8

Valores medios ± SEM (n=4). Diferentes superíndices en columnas indican diferencias significativas: a, b: $P < 0,05$.

En definitiva, los resultados de este estudio sugieren que el proceso de capacitación lleva asociado un efecto de daño en el DNA relacionado generalmente con fenómenos apoptóticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gadella, B.M., Harrison, R.A. 2002. Biol. Reprod. 67, 340-350.
- García-López N, Ollero M, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 1996. Theriogenology 46, 141-151.
- Harrison, R.A.P, Vickers, S.E. 1990. J. Reprod. Fertil. 88, 343-352.
- Li, X., Darzynkiewicz, Z. 1995. Cell Prolif. 28, 571-579.
- Pérez-Pé, R., Grasa, P., Fernández-Juan, M., Peleato, M. L., Cebrián-Pérez, J. A., Muiño-Blanco, T. 2002. Mol Reprod Dev 61, 226-233.
- Weng, S.L., Taylor, S.L., Morshedi, M., Schuffner, A., Duran, E.H., Beebe, S., Oehninger, S. 2002. Mol. Hum. Reprod. 8, 984-991.
- Yanagimachi, R. 1994. Zygote 2, 371-372.

Este trabajo se ha realizado gracias a las ayudas **CICYT-FEDER AGL 2004-02882, INIA RZ03-035, DGA GC-2005-027 and CICYT-FEDER AGL 2005-02614.**