

PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE ESPERMATOZOIDES CON CASPASAS ACTIVAS EN SEMEN OVINO

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

INTRODUCCIÓN

La presencia de espermatozoides apoptóticos en las dosis seminales se ha relacionado con problemas de infertilidad en la especie humana (Said *et al.*, 2006) o de baja fertilidad en algunas especies como la bovina (Anzar *et al.*, 2002). Por ello, el estudio de la apoptosis en una muestra espermática resultaría de gran interés para la predicción de la capacidad fertilizante de dicha muestra.

Nuestro grupo de investigación ha sido pionero en el estudio del proceso apoptótico en espermatozoides ovinos, demostrando que fenómenos relacionados con la apoptosis, como la translocación de la fosfatidilserina o la fragmentación del DNA, existen en semen ovino fresco (Martí *et al.*, 2008). Asimismo hemos evidenciado la presencia de las caspasas 3 y 7 mediante inmunofluorescencia y western-blot (Martí *et al.*, 2008), pero hasta ahora no habíamos analizado el porcentaje de espermatozoides con caspasas activas en muestras de semen ovino. Por ello, el primer objetivo de este trabajo consistió en la puesta a punto de un protocolo adecuado para la evaluación simultánea de actividad de caspasas y de integridad de membrana en espermatozoides ovinos. Y el segundo objetivo fue su aplicación al análisis de muestras de semen fresco, refrigerado y con apoptosis inducida.

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.

Para la determinación de la actividad de caspasas se utilizó el kit Vibrant FAM Caspase-3 and -7 Assay (Invitrogen). Básicamente consiste en un péptido con una secuencia que reconoce específicamente las caspasas 3 y 7 unido a un compuesto fluorescente (FAM-DEVD-FMK), que es permeable y sirve de marcador in situ de apoptosis. Previamente se realizó una dilución del semen en PBS (10^6 cels/ml) y, siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial, se añadieron 10 μ l de la solución de tinción y se incubaron las muestras durante 1 hora en estufa a 37°C y 5% CO₂, protegiéndolas de la luz. Posteriormente se realizaron dos lavados con el tampón de lavado suministrado por el kit, centrifugando a 400 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente, resuspendiendo finalmente el pellet en el tampón. Para la valoración simultánea de la viabilidad se añadieron 2 μ l de yoduro de propidio a la suspensión. Las muestras se analizaron usando un microscopio de fluorescencia o un citómetro de flujo.

El estudio de la actividad caspasa se realizó sobre muestras de semen fresco, muestras refrigeradas y mantenidas durante 3 horas a 15°C y posteriormente lavadas en colchón de sacarosa para eliminar el diluyente, y muestras con apoptosis inducida mediante Ácido Betulínico (60 μ g/ml, 30 min, t^a ambiente).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre los resultados de este trabajo se describen las modificaciones llevadas a cabo respecto al protocolo original para su adaptación, tanto a microscopía, como a citometría de flujo, aplicadas a semen ovino. En primer lugar se sustituyó el yoduro de propidio por homodímero de etidiodo, probando con diferentes cantidades (2 μ l, 1,5 μ l y 1 μ l). Se comprobó que la cantidad óptima era 1 μ l que permitía obtener una buena visualización de las células

y la distinción de cuatro subtipos celulares (Fig. 1): espermatozoides con membrana plasmática intacta y sin actividad caspasa (C-/Et-), espermatozoides con actividad caspasa, con (C+/Et+) o sin membrana plasmática dañada (C+/Et-) y espermatozoides con daño en la membrana plasmática pero sin actividad caspasa (C-/Et+).

Para el análisis de las muestras por citometría, además del uso del homodímero de ethidio, se redujo la cantidad de tinción de FAM-DEVD-FMK a 3 μ l, se eliminaron las centrifugaciones durante el proceso, posteriormente se fijaron las muestras con 3 μ l de FADO, y finalmente se resuspendieron las muestras en 400 μ l de Low Talp o TALP con baja concentración de bicarbonato (Parrish *et al.*, 1988) para evitar la aglutinación celular. De esta manera, tras su paso por el citómetro, podemos evaluar los porcentajes de las cuatro subpoblaciones celulares diferentes descritas anteriormente. Aplicando este protocolo se compararon por citometría muestras de semen ovino frescas, refrigeradas y mantenidas a 15° y con apoptosis inducida (Fig. 2).

La Figura 3 refleja el efecto de la inducción de la apoptosis y la refrigeración sobre la activación de las caspasas. Este efecto consistió en un descenso significativo de los espermatozoides intactos (C-/Et-) respecto a la muestra fresca, lo que se refleja en un aumento del porcentaje de espermatozoides con actividad caspasa (C+/Et- y C+/Et+), siendo de un 67,4% en las muestras con inducción y de un 96,92% en las refrigeradas, respecto al 2,82% en la muestra fresca.

Los resultados de este estudio parecen indicar que la refrigeración a 15°C y la inducción de apoptosis producen una activación significativa de caspasas, siendo aún mayor en los espermatozoides sometidos a refrigeración, y revelan la importancia de los estudios de la apoptosis en relación con el proceso de criopreservación espermática.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anzar M, He L, Buhr MM, Kroetsch TG & Pauls KP (2002). *Biol. Reprod.* 66, 354-60.
- Martí E, Pérez-Pé R, Colás C, Muiño-Blanco T & Cebrián-Pérez JA (2008). *Anim Reprod Sci.* 106, 113-132
- Parrish, JJ, Susco-Parrish J, Winer MA & First NL. (1988). *Biol. Reprod.* 38, 1171-1180
- Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Baumann T, Kriegel C, Li L, Glander HJ, Thomas AJ & Paasch U (2006). *Biol. Reprod.* 74, 530-537

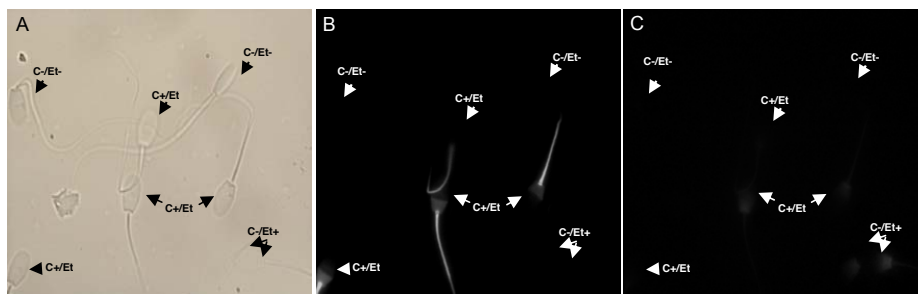
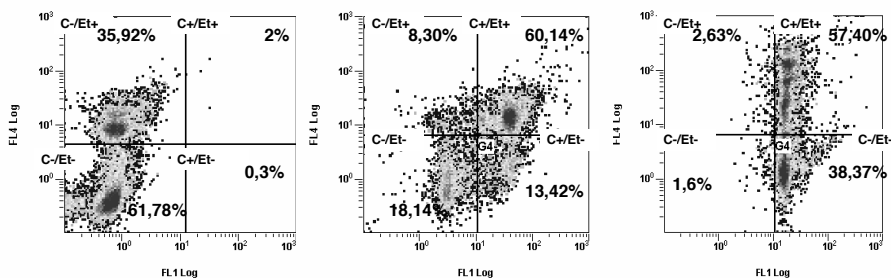


Figura 1.- Imagen representativa al microscopio óptico de las diferentes subpoblaciones de espermatozoides teñidos con indicador de actividad caspasa FAM-DEVD-FMK combinado con homodímero de etidio. En la imagen A se observan las células en campo claro; en la imagen B, los espermatozoides con actividad caspasa presentan fluorescencia verde bajo el filtro estándar de fluoresceína; en la imagen C, los espermatozoides con la membrana plasmática dañada se observan con fluorescencia roja con el filtro estándar de rodamina.



a) muestra fresca b) con apoptosis inducida c) muestra refrigerada

Figura 2.- Citogramas representativos de citometría de flujo de una muestra fresca, con apoptosis inducida (ácido betulínico, 60µg/ml, 30 min.), y refrigerada (15°, 3 horas), con los porcentajes de cada una de las subpoblaciones descritas.

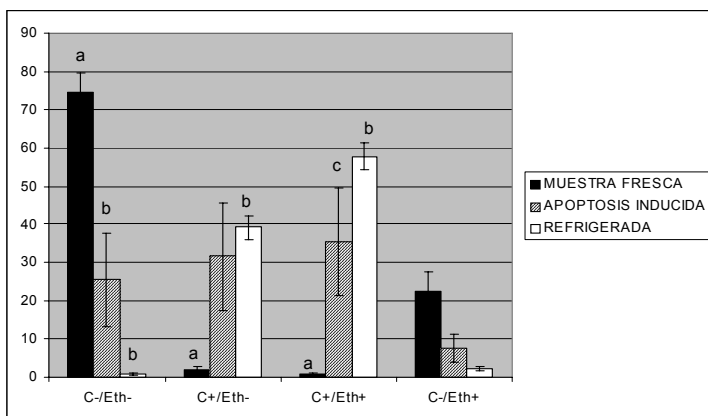


Figura 3.- Valoración de la actividad caspasa y del daño de membrana en espermatozoides ovinos (% espermatozoides). Media ± S.E. (n=4). a,b: P<0,001; a,c: P<0,05. Este trabajo se ha realizado gracias a las ayudas CICYT-FEDER AGL 2007-61229, CICYT-FEDER AGL 2008-01476, DGA A-26 y DGA 040/08. Los autores agradecen a ANGRA el suministro de sementales.

A NEW PROTOCOL FOR THE ASSESSMENT OF ACTIVE CASPASES IN RAM SPERMATOZOA

ABSTRACT: In this study we describe the development of a protocol for simultaneous assessment of caspase activity and membrane integrity of ram spermatozoa, which is applied to fresh, refrigerated and induced-apoptosis (with betulinic acid) semen samples by both fluorescence microscopy and flow cytometry. We distinguished four sperm subpopulations: containing intact-membrane with no caspase activity (C-/Et-, intact sperm), with active caspases either with (C+/Et+) or without (C+/Et-) damaged-membrane, and sperm with damaged-membrane and no caspase activity (C-/Et+). Flow cytometry analysis revealed that refrigeration and betulinic acid induced a significant decrease in the proportion of intact sperm. The proportion of caspase-active sperm was 67.4% in apoptosis-induced and 96.92% in refrigerated samples, while only 2.82% was found in the fresh ones.

Keywords: ram spermatozoa, apoptosis, flow cytometry