

IDENTIFICACIÓN DE cPARP, UN POSIBLE MARCADOR DE CALIDAD SEMINAL, EN ESPERMATOZOIDES DE OVINO

Caspio, A., Álvarez, M., Anel, L., Robles, V., de Paz, P. y Martínez-Pastor, F.
ITRA-ULE, INDEGSAL, Universidad de León, 24071 León, España. E-mail:
felipe.martinez@unileon.es

INTRODUCCIÓN

Un factor crítico para la fertilidad espermática y la viabilidad de la descendencia es la integridad del ADN espermático, especialmente en la aplicación de tecnologías de reproducción asistida (Fernandez-Gonzalez et al., 2008; de Graaf et al., 2009). Se ha propuesto que el daño en el ADN espermático podría estar relacionado con la activación de vías apoptóticas, durante la espermatogénesis, o posteriormente, en el espermatozoide maduro (Aitken y De Iulius, 2010; Said et al., 2010), habiéndose detectado actividad caspasa y otros marcadores apoptóticos en espermatozoides de diversas especies (Cisternas et al., 2006; Grunewald et al., 2009; Marchetti et al., 2004; Martin et al., 2007; Martínez-Pastor et al., 2009). Aunque su presencia y significado es controvertido, estos marcadores podrían servir como indicadores de la calidad seminal.

Las enzimas de la familia poli ADP-ribosa polimerasa (PARP) están implicadas en la reparación del ADN y en la ejecución de ciertos procesos apoptóticos. PARP I es el componente más importante de la familia, e interviene en la señalización de la reparación del ADN y en el control de la estructura de la cromatina, pero su inactivación o sobreactivación desencadenan la muerte celular. La forma activada de la caspasa 3 proteoliza PARP I, dando lugar al fragmento cPARP, que es inactivo. PARP I y su regulación tiene gran importancia durante la espermatogénesis, y se ha detectado en espermatozoides humanos, así como su correlación con varios parámetros apoptóticos y de calidad seminal (Agarwal et al., 2010; Jha et al., 2009; Mahfouz et al., 2009). La evaluación de cPARP en espermatozoides de especies domésticas podría contribuir a la detección de problemas de subfertilidad en machos y a la mejora de las técnicas de conservación seminal. Algunos anticuerpos contra cPARP tienen reactividad cruzada, permitiendo la detección de cPARP en toro y, posiblemente, otros rumiantes.

En este estudio describimos la puesta a punto del marcaje con uno de estos anticuerpos (PARP [214/215] CLEAVAGE, Rabbit Polyclonal Antibody-FITC Conjugated, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), para la detección de cPARP en espermatozoides de carnero. En un experimento preliminar con microscopía de fluorescencia, detectamos un débil marcaje en algunos espermatozoides, pero también lo que parecía ser un marcaje inespecífico en el acrosoma, especialmente en el reborde acrosomal. Nuestros objetivos fueron: 1) eliminar el marcaje inespecífico del anticuerpo e incrementar la señal del anticuerpo en los espermatozoides de carnero y 2) realizar una evaluación de la presencia de cPARP mediante citometría de flujo, combinando el análisis de fracciones separadas por centrifugación en gradiente de Percoll, un promotor de la apoptosis y una incubación prolongada en condiciones capacitantes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los reactivos utilizados fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU) excepto el PARP FITC Apoptosis kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU), el cual contiene el anticuerpo PARP [214/215] CLEAVAGE, Rabbit Polyclonal Antibody-FITC Conjugated y los medios IC Fix™ e IC Perm™. El protocolo de marcaje con el anticuerpo se modificó para adaptarlo a los espermatozoides de carnero. Brevemente, los espermatozoides se lavaron con PBS y el pellet se fijó con 1 mL de formaldehído al 4% en PBS (IC Fix). Tras 20 min en hielo, la muestra se lavó dos veces con PBS y se resuspendió a 20×10^6 espermatozoides/mL en IC Perm. Se separaron 50 μ L y se incubaron a temperatura ambiente y oscuridad con 10 μ L del anticuerpo, durante 30 min. Después se lavó 2 veces con 0,5 mL de IC Perm y una vez con PBS suplementado con 4,5 μ M de Hoechst 33342 (H342). Finalmente, los espermatozoides se resuspendieron en 0,3 mL de PBS y se evaluaron mediante citometría de flujo o microscopía de fluorescencia. El análisis de citometría se realizó con un CyAn ADP (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU), utilizando un láser violeta (405 nm) para excitar el H342 y uno azul (488 nm) para excitar el FITC conjugado con el anticuerpo. La emisión azul del H342 se detectó utilizando un fotodetector provisto de un espejo 485DLP y un filtro

450/50, y la emisión verde del FITC se detectó mediante otro fotodetector provisto de un espejo 650DLP y de un filtro 530/40. Los análisis microscópicos se realizaron con un microscopio equipado con contraste de fases y una lámpara de fluorescencia (filtro de excitación: 450–490 nm; espejo dicróico a 510 nm; filtro de emisión: 520 nm).

En el experimento 1, probamos combinaciones de ditioneitol (DTT, 40 mM) y dodecil sulfato sódico (SDS, 2%). El ditioneitol debería facilitar la entrada del anticuerpo en el núcleo (por reducción de los puentes disulfuro de las protaminas), y el SDS debería facilitar la entrada del anticuerpo por ruptura de membranas y la eliminación del marcaje inespecífico. Tras la eliminación del fijador, las muestras se resuspendieron en PBS o en PBS con DTT, SDS o ambos y se incubaron 30 min a 37 °C. Las muestras se lavaron con IC Perm antes de incubarse con el anticuerpo. Las muestras se analizaron mediante microscopía.

En el experimento 2, el contenido de 10 pajuelas se sometió a una selección por gradiente 45/90 de Percoll (600×g 15 min). La interfase 45/90 como el pellet se lavaron y diluyeron a 5×10⁷ espermatozoides/mL en TALP. Tras 1 h (39 °C, 5% CO₂), se evaluó cPARP (citometría). En ese momento, se separó una alícuota y se añadió 10 μM de wortmanina (un inhibidor de las PI-3-quinasas, que acelera procesos apoptóticos). Tras 12 h de incubación se evaluó el nivel de cPARP de nuevo. Este experimento se realizó por triplicado y los datos se analizaron utilizando el paquete estadístico R (<http://www.r-project.org>), mediante modelos lineales de efectos mixtos (efectos fijos: incubación y tratamiento; efectos aleatorios: replicado).

En ambos experimentos utilizamos semen de carnero congelado en medio TES-Tris-Fructosa (20% yema de huevo, 4% glicerol), a 25×10⁶ espermatozoides/mL. Las pajuelas se descongelaron a 65 °C durante 6 s.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio informamos por primera vez de la detección de cPARP en espermatozoides de carnero. En el experimento 1, los tratamientos con SDS provocaron la aglutinación de los espermatozoides en grandes masas, que no se revirtió en los lavados subsiguientes. Por lo tanto, descartamos el uso de este surfactante. El tratamiento con DTT no sólo incrementó la fluorescencia de la muestra (aunque sólo ligeramente), sino que también redujo la fluorescencia inespecífica en el acrosoma, sin necesidad de incluir SDS en la incubación (Figura 1A).

Los resultados del experimento 2 no mostraron un efecto significativo de la fracción de Percoll ni del tratamiento con wortmanina sobre el marcaje contra cPARP. En cambio, la incubación (Figura 1B) incrementó notablemente la proporción de espermatozoides marcados por el anticuerpo (de 24,6%±3,5 a 42,5%±1,5, media±IC 95%). Estos resultados coinciden en parte con el estudio de Jha et al. (2009) con espermatozoides humanos, en el que no se encontraron diferencias en los niveles de cPARP entre las fracciones separadas por gradiente de densidad (espermatozoides “maduros” e “inmaduros”) o sometidos al inductor de apoptosis estaurosporina. No obstante, estos autores relacionaron los niveles de cPARP con niveles de caspasas y de daño en ADN, así como un aumento en la muerte celular cuando se combinó la estaurosporina con un inhibidor de PARP.

Otros autores han demostrado que la incubación de espermatozoides de carnero provoca un incremento del daño en el ADN y la aparición de marcadores apoptóticos (Lopez-Fernández, 2008; Martí et al., 2008). Es posible que estos resultados estén relacionados con el incremento de cPARP detectado en este estudio. Esta hipótesis se pondrá a prueba en futuros estudios.

En conclusión, en este estudio hemos comprobado que el anticuerpo comercial PARP [214/215] CLEAVAGE, Rabbit Polyclonal Antibody-FITC Conjugated puede ser utilizado para detectar cPARP en espermatozoides de carnero mediante inmunofluorescencia. La preincubación de las muestras con DTT mejoró los resultados de este tipo de ensayo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, A., Mahfouz, R. Z., Sharma, R. K., Sarker, O., Mangrola, D., Mathur, P. P. 2009. *Reprod Biol Endocrinol* 7: 143.
- Mahfouz, R. Z., du Plessis, S. S., Aziz, N., Sharma, R., Sabanegh, E., and Agarwal, A. 2010. *Fertil Steril* 93: 814-21.
- Aitken, R. J., De Iulius, G. N. 2009. *Mol Hum Reprod* 16:3-13
- Cisternas, P., Moreno, R. D. 2006. *Mol Reprod Dev* 73: 1318-1325.
- de Graaf, S. P., Beilby, K. H., Underwood, S. L., Evans, G., Maxwell, W. M. C.

2009. *Theriogenology* 71:89-97. • Fernandez-Gonzalez, R., Moreira, P. N., Perez-Crespo, M., Sanchez-Martin, M., Ramirez, M. A., Pericuesta, E., Bilbao, A., Bermejo-Alvarez, P., de Dios Hourcade, J., de Fonseca, F. R., Gutierrez-Adan, A. 2008. *Biol Reprod* 78: 761-772. • Grunewald, S., Sharma, R., Paasch, U., Glander, H.-J., Agarwal, A. 2009. *Microsc Res Tech* 72: 878-88. • Jha, R., Agarwal, A., Mahfouz, R., Paasch, U., Grunewald, S., Sabanegh, E., Yadav, S. P., Sharma, R. 2009. *Fertil Steril* 91: 782-790. • López-Fernández, C., Fernández, J. L., Gosálbez, A., Arroyo, F., Vázquez, J. M., Holt, W. V., Gosálbez, J. 2008. *Theriogenology* 70: 898-908. • Mahfouz, R. Z., Sharma, R. K., Poenicke, K., Jha, R., Paasch, U., Grunewald, S., Agarwal, A. 2009. *Fertil Steril* 91: 2210-2220. • Marchetti, C., Gallego, M.-A., Defosse, A., Formstecher, P., Marchetti, P. 2004. *Hum Reprod* 19: 1127-1134. • Marti, E., Perez-Pe, R., Colas, C., Muino-Blanco, T., Cebrian-Perez, J. A. 2008. *Anim Reprod Sci* 106: 113-132. • Martin, G., Cagnon, N., Sabido, O., Sion, B., Grizard, G., Durand, P., Levy, R. 2007. *Hum Reprod* 22: 380-388. • Martínez-Pastor, F., Aisen, E., Fernández-Santos, M. R., Estes, M. C., Maroto-Morales, A., García-Alvarez, O., Garde, J. J. 2009. *Reproduction* 137: 225-35. • Said, T. M., Gaglani, A., Agarwal, A. 2010. *Reprod Biomed Online* 21:456-462.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado en parte por la CICYT (AGL2010-15758) y por el programa Ramón y Cajal (RYC-2008-02560).

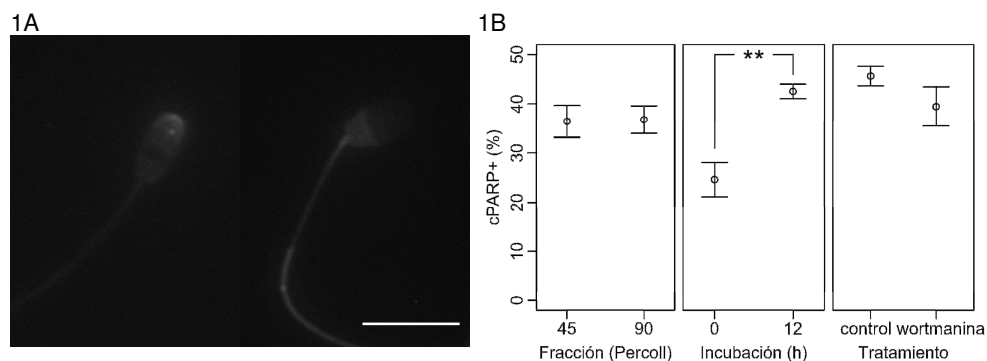


Figura 1A: Patrón de marcaje de cPARP sin (izquierda) y con incubación con DTT (derecha). Al incubar con DTT se elimina el marcaje en el reborde acrosomal. **Figura 1B:** Resultados de la evaluación de espermatozoides cPARP+ (medias e intervalos de confianza al 95%). Sólo la incubación prolongada a 39 °C tuvo un efecto significativo (** $P < 0,01$).

DETECTION OF cPARP, A POTENTIAL MARKER OF SEMINAL QUALITY, IN OVINE SPERMATOZOA

ABSTRACT: Poly ADP-ribose polymerase (PARP) is an important effector of both DNA repair and apoptotic pathways, and it takes part in spermatogenesis. It is possible that the presence of caspase-cleaved PARP (cPARP) could be used as a biomarker of sperm quality. For the first time, we have detected cPARP in frozen/thawed ram spermatozoa, using immunolabelling. In order to remove unspecific labelling from the acrosomal ridge and to increase general labelling, we incubated spermatozoa with 40 mM dithiothreitol (DTT) and/or 2% dodecil sulfato sódico (SDS). SDS was discarded because of agglutination, but DTT increased labelling while removing the labelling in the acrosomal ridge. In a second experiment, we tested cPARP presence in the interface and pellet after a 45/90 Percoll gradient, after 12 h incubation in capacitating conditions and in the presence of the PI3K inhibitor wortmannin (an apoptosis promoter). Only long incubation had a significant effect, doubling the proportion of cPARP+ spermatozoa. The detection of cPARP could improve our ability to understand and assess sperm quality.

Keywords: ram semen, cPARP, immunolabelling, apoptosis.