

RELACIÓN ENTRE MARCADORES APOPTÓTICOS Y FERTILIDAD EN SEMEN OVINO

Mendoza, N.¹, Casao, A.¹, Pérez-Pé, R.¹, Quintín, F.², Sevilla, E.², Laviña, A.³, Fantova, E.⁴, Cebrián-Pérez, J.A.¹ y Muño-Blanco, T.¹

¹Dep. Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), Facultad de Veterinaria. ²Área Técnica de Producción, Selección y Reproducción Animal. Centro de Transferencia Agroalimentaria (CTA).

³ANGRA. ⁴UPRA-Grupo Pastores. Zaragoza. España. E-mail: noe_magen@yahoo.es

INTRODUCCIÓN

Nuestro grupo de investigación ha mostrado recientemente que la inducción de la capacitación así como el proceso de refrigeración producen un aumento de algunos marcadores relacionados con la apoptosis en esperma ovino. Esto es de vital importancia para el diseño de protocolos de criopreservación, ya que el enorme daño producido por la congelación a espermatozoides ovinos estaría relacionado, al menos en parte, con procesos apoptóticos. Sin embargo, hasta el momento, no se sabe cómo está afectando la presencia de espermatozoides apoptóticos a la fertilidad de las dosis seminales.

Los espermatozoides eyaculados presentan evidencias de fragmentación de ADN (Sakkas et al., 2004), caspasas activas (Paasch et al., 2004a; Marti et al., 2006), proteasas responsables de la fragmentación de sustratos específicos durante la apoptosis, y translocación de fosfatidilserina, un fosfolípido que en condiciones normales se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática, y que, durante la apoptosis pasa a la cara externa (Duru et al., 2001; Paasch et al., 2003a) actuando como señal de reconocimiento para que la célula sea fagocitada sin producir respuesta inflamatoria. Y se ha sugerido que la presencia de espermatozoides apoptóticos en semen podría ser una de las razones de baja fertilidad en diversas especies (Anzar et al., 2002). Como la fecundación es un proceso que requiere varias capacidades espermáticas, la combinación de distintas técnicas de análisis de funcionalidad espermática permitiría aumentar la capacidad predictiva de la fertilidad (Amann y Hammerstedt, 1993).

Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido analizar la posible correlación entre marcadores apoptóticos, parámetros de funcionalidad espermática y fertilidad mediante inseminación artificial (IA) rutinaria con semen ovino refrigerado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para los experimentos *in vitro*, la obtención del semen se realizó mediante vagina artificial y se emplearon moruecos adultos entre 2 y 4 años, pertenecientes a la Asociación Nacional de Criadores de Ganado selecto de la raza Rasa Aragonesa (ANGRA). Se utilizaron espermatozoides libres de plasma seminal mediante el método de *swim-up* dextrano, y para disponer de un control positivo adecuado, pusimos a punto un método de inducción de apoptosis en espermatozoides utilizando dos agentes químicos: ácido betulínico (AB) y Fas ligando (FasL) (60 µg/ml y 2 mg/ml respectivamente, 30 minutos, temperatura ambiente). La refrigeración de las muestras se realizó en baño de agua a 15 °C durante 30 minutos.

Para los experimentos *in vivo* se empleó semen ovino procedente de moruecos de raza Rasa Aragonesa, de 3-7 años de edad, pertenecientes a ANGRA y UPRA-Grupo Pastores. La obtención del semen mediante vagina artificial, estimación de la motilidad espermática, refrigeración de las dosis, y la inseminación artificial (IA) rutinaria en campo se llevaron a cabo por el personal técnico especializado de dicho centro y de ambas empresas a lo largo de los años 2008-2009. Se inseminaron 649 ovejas de 40 granjas distintas, con 94 dosis diferentes procedentes de 15 sementales, y se registraron datos de fertilidad, prolificidad y fecundidad. Una alícuota de cada dosis inseminada se mantuvo a 15 °C hasta su llegada al laboratorio, donde se centrifugó en colchón de sacarosa para eliminar el diluyente.

La traslocación de fosfatidilserina (FS) se evaluó con Anexina V en combinación con yoduro de propidio (IP; Citometría de flujo) o con CFDA (Microscopía de fluorescencia) que permite la valoración simultánea de la viabilidad. El daño en el ADN se estudió mediante la técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase mediated-dUTP Nick End Labelling*) usando el kit *In situ cell death detection* kit, con fluoresceína (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Para la determinación de la actividad de caspasas se utilizó el kit

Vibrant FAM Caspase-3 and -7 Assay (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) combinado con homodímero de etidio. La valoración del estado de capacitación se llevó a cabo mediante la tinción con clorotetraciclina (CTC) (Pérez-Pé et al., 2002). Las diferencias significativas se determinaron mediante ANOVA, y las correlaciones usando coeficiente de Pearson.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La refrigeración y la inducción de apoptosis, tanto con ácido betulínico como con Fas ligando, produjeron pérdida de viabilidad y aumento de inversión de FS (Figura 1), así como del daño en el ADN ($10,77 \pm 0,8\%$, $11,8 \pm 0,9\%$, $13,6 \pm 3,2\%$ vs. $7,8 \pm 1\%$, en muestras refrigeradas, con AB, con FasL vs. control, respectivamente) y actividad caspasa ($44 \pm 2,2\%$, $27,7 \pm 2,5\%$, $23,4 \pm 4\%$ vs. $22,7 \pm 1,2\%$, respectivamente).

En el estudio *in vivo*, se analizó la posible correlación entre marcadores apoptóticos y del estado de capacitación con la fertilidad obtenida mediante IA rutinaria en campo. Los resultados presentados en la Tabla son preliminares ya que el estudio sigue en realización.

Considerando todas las muestras en conjunto, se encontró una correlación negativa entre un parámetro apoptótico, la inversión de FS, y la motilidad ($r = -0,283$; $P < 0,01$). Estos resultados concuerdan con los resultados de fertilidad ya que se obtuvo una correlación negativa entre la inversión de FS y la fertilidad ($r = -0,256$; $P < 0,05$). Además, también se encontró correlación positiva entre la fertilidad y el porcentaje de espermatozoides no capacitados vivos ($r = 0,263$; $P < 0,05$).

Clasificando las muestras de acuerdo con la época del año, se encontraron mayores valores de marcadores apoptóticos durante la ENR. El porcentaje de espermatozoides sin inversión de fosfatidilserina fue significativamente menor ($P < 0,001$), y el de los que tienen el ADN dañado fue mayor en ENR que en ER (Tabla y Figura 2). De nuevo, los resultados de IA revelaron una correlación positiva ($r = 0,401$; $P < 0,01$) entre el porcentaje de espermatozoides sin FS invertida y la fertilidad en ER. Además, en ENR encontramos una correlación negativa entre la fertilidad y el porcentaje de espermatozoides con el ADN dañado ($r = 0,468$; $P < 0,05$).

En conclusión, la refrigeración de espermatozoides ovinos produce un aumento de marcadores apoptóticos, que podría traducirse en una pérdida de capacidad fecundante ya que los resultados de IA revelaron una correlación significativa entre algunos marcadores apoptóticos y la fertilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, A. y Said, T.M., 2005. *BJU int* 95, 503-507.
- Amann, RP. y Hammerstedt, R.H., 1993. *J. Androl* 14, 397-406.
- Anzar, M, He, L., Buhr, M.M, Kroetsch, T.Q., Pauls, K.P., 2002. *Biol Reprod* 66, 354-360.
- Duru, N.K., Morshedi, M. Schuffner, A. Oehninger, S. 2001. *Fertil Steril* 75(2): 263-268.
- Lopes, S., Sun, J.G., Jurisicova, A., Meriano J., y Casper R.F., 1998. *Fertil Steril* 69(3): 528-532.
- Martí, E, Perez-Pe, R., Muino-Blanco, T. Cebrian-Perez, J. A., 2006, *J. Androl* 27, 746-753.
- Paasch, U., Grunewald, S. Thomas, A. J., Jr. Glander, H. J., 2003 *J. Androl* 24(2), 246-252
- Paasch, U. Grunewald, S. Agarwal, A. Glandera, H. J., 2004, *Fertil Steril* 81, 802-809
- Pérez-Pé R, Grasa P, Fernandez-Juan M, Peleato ML, Cebrián-Pérez JA, y Muiño-Blanco T, 2002: *Mol Reprod dev* 61, 226-233.
- Sakkas, D.Seli, E.Manicardi, G. C.Nijs, M.Ombelet, W.Bizzaro, D. 2004, *Human Fertility (Cambridge)*7(2), 99-103.

Agradecimientos: CICYT-FEDER AGL 2007-61229, AGL 2008-01476, DGA A-26 y 040/08.

Tabla 1. Calidad espermática y parámetros reproductivos obtenidos de todas las muestras en total, y clasificadas según la época del año, reproductiva (ER) o no reproductiva (ENR). Valores medios \pm error estándar de la media. * $P < 0,001$.

Eyacuados	Total (n=94)	ER (n=67)	ENR (n=27)
Vivos sin inversión de FS (%)	$36,11 \pm 1,5$	$40 \pm 1,8$	$27,44 \pm 2,0^*$
Daño en ADN (%)	20 ± 1	$19,36 \pm 1,7$	$21,85 \pm 1,8^*$
No capacitados vivos (%)	$15,9 \pm 1,18$	$13,66 \pm 1,23$	$21,33 \pm 2,4$
Motilidad individual (%)	$83,5 \pm 0,24$	$83,2 \pm 0,31$	$84,25 \pm 0,3$
Fertilidad (%)	$38,86 \pm 3,33$	$32,9 \pm 2,9$	$54,00 \pm 4,8$
Prolificidad	$1,39 \pm 0,06$	$1,33 \pm 0,07$	$1,54 \pm 0,11$
Fecundidad	$1,07 \pm 0,06$	$1,1 \pm 0,07$	$1,00 \pm 0,10$

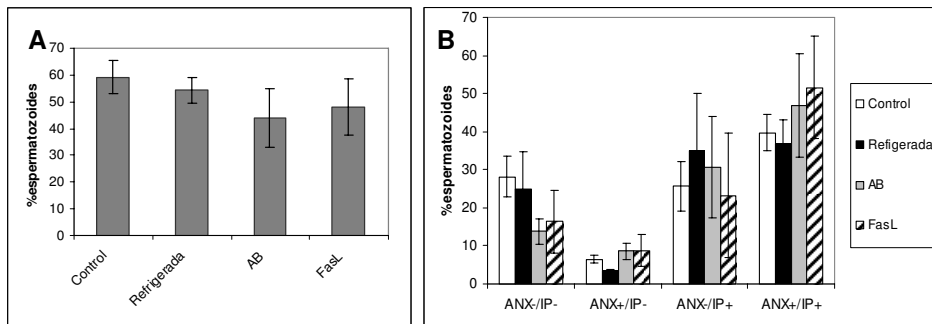


Figura 1. Influencia de la refrigeración, y la inducción de apoptosis con AB y con FasL en el porcentaje de espermatozoides viables (A) y porcentaje de espermatozoides con traslocación de fosfatidilserina (FS) (ANX+) mediante la tinción con AnexinaV/IP (B). Valores medios \pm error estándar de la media de 3 ensayos.

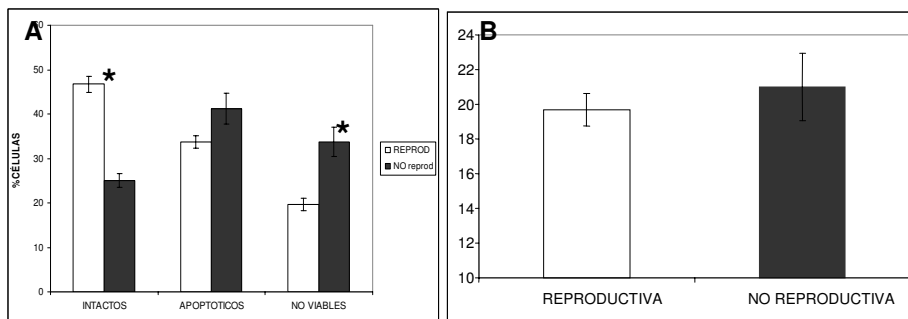


Figura 2. Diferencias entre estación reproductiva y no reproductiva en las tres subpoblaciones espermáticas distinguidas mediante la tinción con AnexinaV/CFDA (A): Intactos, sin inversión de FS; apoptóticos, CFDA+/PS traslocada; no viables, CFDA-/PS traslocada; (B): Porcentaje de espermatozoides con ADN dañado. Valores medios \pm error estándar de la media. *: $P < 0,01$.

RELATIONSHIP BETWEEN APOPTOTIC MARKERS AND FERTILITY IN RAM SEMEN

We have previously shown that semen refrigeration and *in vitro* capacitation induce increases in certain apoptotic-related markers, although the influence of apoptotic sperm in fertility has not been determined yet. Therefore, in this study, we analysed the relationship between apoptotic and sperm functionality markers and fertility rate obtained by routine artificial insemination (AI) with refrigerated ram semen. A total of 649 ewes were inseminated with 94 different doses. The obtained results showed a negative correlation ($r = -0,283$; $P < 0,01$) between the proportion of sperm with inverted phosphatidylserine (PS) and motility. These findings agree with the obtained fertility data as we found correlation between fertility and PS inversion ($r = -0,256$; $P < 0,05$), and the percentage of viable, non-capacitated sperm ($r = 0,263$; $P < 0,05$). Furthermore, we found a negative correlation between fertility and damaged-DNA in the non-reproductive season ($r = 0,468$; $P < 0,05$).

Keywords: sperm, phosphatidylserine, damaged-DNA.