

## LA TÉCNICA ISAS@3FUN PERMITE UNA DETERMINACIÓN PRECISA DE LA INTEGRIDAD DEL ACROSOMA EN ESPERMATOZOIDES DE TORO

Yániz<sup>1</sup>, J., Palacín<sup>1</sup>, I., Silvestre<sup>2</sup>, M.A., Olegario<sup>3</sup>, C.O., Tamargo<sup>3</sup>, C. y Santolaria<sup>1</sup>, P.

<sup>1</sup>Grupo de investigación BIOFITER. Instituto IUCA. Universidad de Zaragoza, Huesca, España;

<sup>2</sup>Departamento de Biología Celular, Biología Funcional y Antropología Física. Universitat de València. 46100 Burjassot, Valencia, España; <sup>3</sup>Area de Reproducción y Genética, SERIDA, 33394 Deva, Gijón, España; jyaniz@unizar.es

### INTRODUCCIÓN

En estudios previos (Yániz *et al.*, 2017, 2018; Palacín *et al.*, 2020), describimos una combinación de fluocromos (ISAS@3fun) que permite discriminar la viabilidad espermática, la integridad acrosómica y la funcionalidad en toros. Este estudio fue diseñado para comparar la eficacia de esta técnica con la combinación convencional de FITC-PNA/yoduro de propidio (PNA/PI) antes y después de la incubación en condiciones de capacitación e inducción de la reacción acrosómica.

### MATERIAL Y MÉTODOS

En el estudio se utilizaron muestras de semen criopreservadas de 32 toros comerciales Holstein. Tras su descongelación, se indujo la capacitación mediante incubación en medio TALP con 10 IU/ml de heparina de sodio durante 4h a 39 °C y 5% CO<sub>2</sub>. A continuación, se añadió ionomicina para inducir la reacción acrosómica y las muestras se incubaron una hora más en las mismas condiciones. A las 0h, 4h (tras inducir la capacitación) y 5h (tras inducir la reacción acrosómica) se tomaron alícuotas para evaluar la integridad de la membrana plasmática y acrosómica con PNA/PI y el ISAS@3fun, siguiendo los protocolos descritos en Palacín *et al.*, (2020) y Robles y Martínez-Pastor (2013). Los resultados se muestran como media ± SD.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de espermatozoides con acrosomas dañados a las 0, 4 h y 5h fue de 33,35 ± 8,60, 34,75 ± 10,99 y 40,84 ± 7,67, respectivamente, cuando se determinó con PNA/IP y de 41,64 ± 7,57, 50,67 ± 7,40 y 64,66 ± 7,76 cuando se determinó con la técnica ISAS@3fun. Por lo tanto, el daño acrosómico fue mayor en todos los tiempos y aumentó en mayor medida con la capacitación y la inducción de la reacción acrosómica cuando se utilizó el método ISAS@3fun. Utilizando microscopía de contraste de fases se observó que muchos espermatozoides sin acrosoma no se tiñeron con el PNA, generando falsos negativos que probablemente llevaron a una subestimación de la extensión del daño acrosómico. Se confirma que los sitios de unión a lectina desaparecen después de un daño acrosómico extenso, tal y como sugieren otros autores (Martínez-Pastor *et al.*, 2010), lo que produce falsos negativos y conduce a una subestimación de la lesión acrosómica. El patrón de tinción del ISAS@3fun es opuesto al del PNA, por lo que solo los espermatozoides con acrosomas intactos contienen esterasas capaces de hidrolizar el CFDA a carboxifluoresceína, emitiendo una intensa fluorescencia verde. Este fluorocromo tiene un peso molecular bajo y, por tanto, se pierde rápidamente tras el daño de la membrana acrosómica, evitando falsos negativos. Como consecuencia, ISAS@3fun fue particularmente sensible para evaluar la integridad acrosómica en toros.

### CONCLUSIÓN

El desafío con ionóforo permitió validar la utilización del ISAS@3fun para cuantificar la integridad del acrosoma en toros, mostrando una mayor sensibilidad que la tinción clásica con lectinas.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Martínez-Pastor, F. *et al.* 2010. *Reprod. Domest. Anim.* 45: 67-78. • Palacín, I. *et al.*; 2020. *Asian J. Androl.*, 22: 578-582. • Robles, V. y Martínez Pastor, F. 2013. *Methods Mol. Biol.* 97: 175-186. • Yaniz, J. *et al.* 2017 *Anim. Reprod. Sci.* 181: 108-114. • Yániz J. *et al.* 2018. *Reprod. Fertil. Dev.* 30: 913-923.

**Agradecimientos:** Este trabajo fue financiado por (1) AGL-2017- 85030-R de la Agencia Española Estatal de Investigación del Gobierno de España y el European Regional Development Fund (ERDF), (2) A07-17R del Gobierno de Aragón y la European Social Fund (ESF), (3) ERDF 2014-2020 "Construyendo Europa desde Aragón".