

Artículo corto:

COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE LAVADO Y TIEMPOS DE CONSERVACIÓN DE LOS FROTIS PARA EVALUAR EL ACROSOMA EN ESPERMATOZOIDES DE LLAMA MEDIANTE LA TINCIÓN DE COOMASSIE BLUE

Comparison of washing methods and smear conservation periods for llama sperm acrosome assessment using the Coomassie Blue stain.

F.G. Fumuso^{1,3}, M.L. Giménez¹, D.M. Neild^{1,3}, S.M. Giuliano^{2,3}, M.G. Chaves^{1,3}, M.I. Carretero^{1,3}

¹Cátedra de Teriogenología, ²Cátedra de Física Biológica, ³Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA),
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

E-mail (Fernanda Fumuso): fernandafumuso@yahoo.ar ; (Ignacia Carretero): ignaciacarretero@fvvet.uba.ar

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue comparar métodos de lavado y conservación de frotis para evaluar el acrosoma en espermatozoides de llama mediante la tinción con Coomassie Blue (CB), con el propósito de facilitar la técnica e independizar los momentos de la extracción de semen de la evaluación de los acrosomas espermáticos. Se procesaron 12 eyaculados, se probaron dos tipos de lavado de los frotis fijados (con PBS o solución fisiológica, SF) y se evaluaron diferentes temperaturas (5° C y temperatura ambiente) y tiempos (0, 1 y 7 días) de conservación. Se evaluaron los siguientes frotis (cada uno lavado con PBS o con SF): 1) fijados, teñidos y evaluados el mismo día de la extracción; 2) fijados, teñidos y conservados 24 hs a temperatura ambiente y luego evaluados; 3) fijados, conservados a 4° C durante 1 día y luego teñidos y evaluados; 4) fijados, conservados a 4° C durante 7 días y luego teñidos y evaluados. Se evaluaron un total de 8 frotis por eyaculado. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de acrosomas presentes evaluado por CB entre las dos metodologías de lavado de los frotis fijados, ni entre las diferentes temperaturas y los diferentes tiempos de conservación de los frotis. Conclusión: es posible utilizar solución fisiológica para lavar los frotis fijados facilitando la técnica de CB para evaluar la presencia de los acrosomas en espermatozoides de llama. Además, se logró independizar los momentos de la extracción de semen de la evaluación de los acrosomas espermáticos.

Palabras clave: *acrosoma, espermatozoide, Coomassie Blue, llama (Lama glama).*

ABSTRACT

The objective of this study was to compare washing methods and smear conservation periods for llama sperm acrosome assessment using the Coomassie Blue stain, with the aim of facilitating the technique and to allow the moment of sperm acrosome evaluation become independent of the moment of semen collection. Twelve ejaculates were processed; two types of washing of the smears (with PBS or with physiologic solution, PS) and different temperatures (5 °C and room temperature) and periods of conservation (0, 1 and 7 days) were assessed. The following smears were evaluated: 1) fixed, stained and evaluated the same day of collection; 2) fixed, stained and conserved for 24 hours at room temperature and then evaluated; 3) fixed, conserved at 4° C for 1 day and then stained and evaluated and 4) fixed, conserved at 4° C for 7 days and then stained and evaluated. A total of 8 smears per ejaculate were evaluated. No significant differences were observed in the percentages of acrosomes present, evaluated by CB, between both types of washing of the fixed smears, nor between the different temperatures and conservation periods of the fixed smears. Conclusions: it is possible to use physiologic solution to wash the fixed smears, thus facilitating the Coomassie Blue technique used to evaluate the presence of llama sperm acrosomes. In addition, it was possible to separate the moment of sperm acrosome evaluation from the semen collection.

Keywords: *acrosome, spermatozoa, Coomassie Blue, llama (Lama glama).*

INTRODUCCIÓN

Los Camélidos Sudamericanos (CSA) producen una fibra fina natural codiciada a nivel internacional debido a su excepcional calidad y una carne con características óptimas para los requerimientos actuales del mercado (carnes magras con bajo contenido de colesterol). También, constituyen casi la única fuente de proteína animal para las poblaciones altoandinas. Por otra parte, el aumento en la comercialización de productos derivados de los CSA hace necesario utilizar estrategias reproductivas tendientes a mejorar la producción y la genética de los rodeos.

La integridad de las membranas plasmática y acrosomal es de gran importancia para la funcionalidad de los espermatozoides. Esto cobra especial relevancia teniendo en cuenta que luego de la refrigeración y del congelamiento profundo se ha observado que los espermatozoides de varias especies evidencian cambios similares a los de la capacitación, efecto que se ha llamado “criocapacitación” (carnero: Gillan *et al.*, 1997; cerdo: Maxwell y Johnson, 1997; toro: Cormier *et al.*, 1997; equino: Neild *et al.*, 2003). En la actualidad existen varias pruebas para evaluar la integridad y/o funcionalidad de la membrana plasmática, entre ellas las tinciones vitales con fluorocromos (como la tinción con Diacetato de 6-carboxifluoresceína e Ioduro de Propidio) y la prueba hipoosmótica, ambas utilizadas de rutina para evaluar semen de llama (Giuliano *et al.*, 2010; Carretero *et al.*, 2012). Con respecto a la evaluación de la membrana acrosomal se han utilizado varias técnicas, muchas de ellas costosas requiriendo de un equipamiento no disponible para el trabajo a campo. En la llama se ha utilizado la tinción con Coomassie Blue para evaluar la presencia y/o ausencia del capuchón acrosomal (Giuliano *et al.*, 2012). Esta técnica es sencilla, económica, rápida y se puede realizar en cualquier laboratorio de espermatozoología. Por otra parte, la incorporación de técnicas que evalúen características seminales diferentes a las de rutina permitiría una evaluación más completa de los eyaculados y además permitiría evaluar los diferentes efectos que tienen sobre los espermatozoides de llama los procesos realizados *in vitro*, con el objetivo último de mejorar las técnicas de reproducción asistida utilizadas en la especie. Sin embargo, la evaluación de múltiples características espermáticas está limitada por la cantidad de pruebas que puedan evaluarse simultáneamente.

Los objetivos de este trabajo fueron 1) evaluar dos tipos de lavado de los frotis fijados (PBS o solución fisiológica), para posteriormente teñirlos con Coomassie Blue y 2) evaluar el efecto de diferentes temperaturas y tiempos de conservación de los frotis sobre la efectividad de la tinción de CB, con la finalidad de independizar los momentos de la extracción de semen de la evaluación de los acrosomas espermáticos.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Se obtuvieron un total de 12 eyaculados de 5 machos llama mediante electroeyaculación bajo anestesia general de acuerdo a la técnica descrita por Director y col., (2007). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité del Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires (protocolo 2014/16).

Evaluación de las características seminales.

Se evaluaron las siguientes características seminales en el semen fresco: volumen, motilidad espermática, concentración y funcionalidad e integridad de membranas. La motilidad fue evaluada utilizando microscopio de contraste de fase (100x) y platina térmica (37° C).

La concentración espermática fue calculada utilizando una cámara de Neubauer. La funcionalidad de membranas fue evaluada utilizando el test hipoosmótico (HOS) y la integridad de membranas fue evaluada utilizando diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA) e ioduro de propidio (PI) de acuerdo a Giuliano *et al.* (2010). Brevemente, para la prueba de HOS, 50 µl de semen fueron incubados con 200 µl de una solución hipoosmótica conteniendo fructosa y citrato de sodio (50 mOsm). Luego de la incubación se evaluaron un mínimo de 200 espermatozoides utilizando microscopio de contraste de fase. La osmolaridad de las soluciones fueron medidas utilizando un osmómetro automático (Osmomat® 030). Para evaluar la integridad de membranas, 50 µl de semen fueron incubados a 37° C por 10 minutos en 510 µl de un medio de tinción. Este medio estaba formado por 500 µl de solución salina isotónica y 10 µl CFDA (0,5 mg/ml). Posteriormente, se agregaron 10 µl PI (0,5 mg/ml) y se incubó a 37° C por otros 10 minutos. Un mínimo de 200 espermatozoides fueron evaluados mediante microscopía de fluorescencia.

Evaluación del acrosoma espermático.

Para evaluar el estado del acrosoma, las muestras fueron incubadas con colagenasa al 0,1% en medio H-TALP, con el objetivo de disminuir la filancia de los eyaculados y evitar la tinción de fondo (Giuliano *et al.*, 2010). Brevemente las muestras de semen se diluyeron en una proporción 4:1 con la enzima y se incubaron durante 4 minutos a 37° C. Posteriormente se centrifugaron durante 10 minutos a 800 g y el pellet obtenido se resuspendió con H-TALP a una concentración de 20×10^6 espermatozoides/ml. Se realizaron frotis que se secaron al aire y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS. Los frotis se lavaron, se teñieron con Coomassie Blue al 0,22% durante 5 minutos y se observaron en microscopio óptico a 1000x (Giuliano *et al.*, 2012). Se realizó el siguiente diseño con el objetivo de facilitar la técnica (lavado de los frotis fijados con PBS o con solución fisiológica, SF) y de independizar los momentos de la extracción de semen de la evaluación de los acrosomas espermáticos:

1. Fijación, lavado con PBS o SF, tinción y evaluación en el momento.
2. Fijación, lavado con PBS o SF, tinción, conservación a temperatura ambiente (TA) durante 1 día y evaluación.
3. Fijación, lavado con PBS o SF, conservación a 4° C durante 1 día, tinción y evaluación.
4. Fijación, lavado con PBS o SF, conservación a 4° C durante 7 días, tinción y evaluación.

Análisis estadístico.

Para evaluar el porcentaje de espermatozoides con acrosoma presente y/o ausente en los diferentes tratamientos, se realizó un diseño factorial de 2 factores con 2 y 4 niveles cada uno, tomando al macho como bloque (Primer factor: tipo de lavado con los niveles PBS y SF, y segundo factor: tipo de conservación con los niveles: 1, 2, 3 y 4). Se utilizó el programa Statistix para realizar el análisis estadístico de los datos.



RESULTADOS

Las características seminales de rutina fueron similares a los observados en trabajos previos. Los valores fueron (promedio \pm DS): volumen (ml): $2,2 \pm 1,2$; motilidad (%): $25,4 \pm 19,6$; concentración (espermatozoides/ml): $63,9 \pm 51,0$; funcionalidad de membranas (%): $23,1 \pm 6,5$ y viabilidad o integridad de membranas (%): $48,3 \pm 10,2$.

Con respecto a la técnica de CB, los patrones visualizados fueron: acrosoma presente (CB teñido) y acrosoma ausente (CB no teñido) (Figura 1).

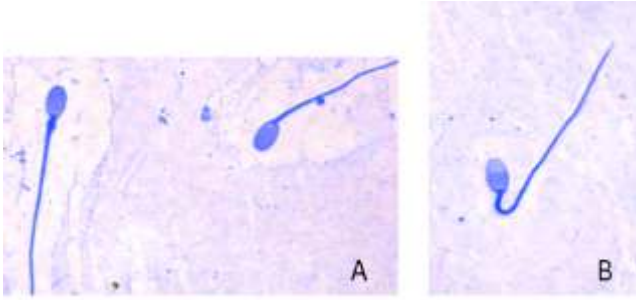


Figura 1. Espermatozoides de llama teñidos con la tinción de Coomassie Blue: A) espermatozoides con capuchón acrosomal presente (CB teñidos) y B) espermatozoides con capuchón acrosomal ausente (CB no teñidos).

Tabla 1. Porcentajes de espermatozoides de llama con presencia (CB teñido) o ausencia (CB no teñido) del capuchón acrosomal evaluados con Coomassie Blue. Los frotis fueron lavados con PBS o solución fisiológica y conservados de diferentes maneras (1, 2, 3 y 4) (n=5 machos, 12 eyaculados).

Tipo de lavado		CB Teñido (promedio \pm DS)	CB No teñido (promedio \pm DS)
PBS	1	$91,6 \pm 6,5^*$	$8,4 \pm 6,5^*$
	2	$92,4 \pm 6,7^*$	$7,6 \pm 6,7^*$
	3	$93,5 \pm 5,3^*$	$6,5 \pm 5,3^*$
	4	$92,5 \pm 6,2^*$	$7,5 \pm 6,2^*$
SF	1	$90,2 \pm 8,4^*$	$9,8 \pm 8,4^*$
	2	$90,8 \pm 6,6^*$	$9,2 \pm 6,6^*$
	3	$91,9 \pm 6,1^*$	$8,1 \pm 6,1^*$
	4	$91,8 \pm 7,8^*$	$8,2 \pm 7,8^*$

1: tinción y observación el día de la extracción, 2: conservación del frotis teñido a TA durante 1 día, 3: conservación del frotis fijado a 4° C durante 1 día y 4: conservación del frotis fijado a 4° C durante 7 días ($P > 0,05$).

No se observó interacción entre el método de lavado (PBS y SF) y la temperatura y el tiempo de conservación (1, 2, 3 y 4). No se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en ninguno de los patrones de CB entre las dos metodologías de lavado (PBS o SF). Tampoco se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en los patrones de CB entre las diferentes temperaturas y los diferentes tiempos de conservación (1: tinción y observación en el momento, 2: conservación del frotis teñido a TA durante 1 día; 3: conservación del frotis fijado a 4° C durante 1 día y 4: conservación del frotis fijado a 4° C durante 7 días ($P > 0,05$)). Los valores pueden observarse en la tabla.

DISCUSIONES

La reacción acrosomal (RA) es un proceso exocitótico que permite que el espermatozoide atraviese la zona pelúcida y fecunde al ovocito. Este proceso involucra la fenestración y vesiculización de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, llevando a la liberación del contenido acrosomal. Como se ha mencionado, se han desarrollado varias técnicas para evaluar la RA en diferentes especies, muchas de las cuales requieren de un equipamiento no disponible en un laboratorio a campo. En la llama existe un reporte que evalúa la presencia o ausencia del capuchón acrosomal a través de la tinción con CB (Giuliano *et al.*, 2012). Esta técnica es sencilla, económica y se ha utilizado en otras especies para evaluar la RA (Larson y Miller, 1999; Brum *et al.*, 2006). El objetivo de nuestro trabajo fue facilitar la técnica de CB utilizando solución fisiológica en lugar de PBS para lavar los portaobjetos fijados con paraformaldehído. Los resultados mostraron que no se observaron diferencias significativas entre las dos metodologías de lavado por lo que la SF podría reemplazar al PBS. Por otra parte, al evaluar la temperatura y el tiempo de conservación de los frotis, no se observaron diferencias significativas entre las diferentes variantes. Estos resultados indicarían que los frotis podrían ser fijados, conservados a 4° C por un período de 7 días y finalmente teñirlos en el momento de la evaluación. Otra alternativa, podría ser teñir los frotis el mismo día de la extracción, conservarlos a temperatura ambiente y observarlos al siguiente día. Los resultados obtenidos simplifican aún más la técnica de CB y permiten la evaluación simultánea de varias características seminales al poder evaluar el estado del acrosoma en un día diferente al de la extracción de la muestra de semen.

CONCLUSION

Es posible evaluar la presencia y/o ausencia de los acrosomas en espermatozoides de llama utilizando solución fisiológica para lavar los frotis fijados, facilitando la técnica de CB. También, es posible evaluar el estado de los acrosomas en un momento diferente al de la extracción de semen.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue subsidiado por el proyecto UBACyT 20020120200270BA.

REFERENCIAS

- Brum AM, Thomas AD, Sabeur K, Ball BA. Evaluation of Coomassie blue staining of the acrosome of equine and canine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 2006; 67: 358-362.
- Carretero MI, Lombardo D, Arraztoa CC et al.. Evaluation of DNA fragmentation in llama (*Lama glama*) sperm using the Sperm Chromatin Dispersion test. *Anim. Reprod. Sci.* 2012; 131 (1-2): 63-71.
- Cormier S, Sirard MA, Bailey JL. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J. Androl.* 1997; 18: 461-468.
- Director A, Giuliano S, Trasorras V, et al.. Electroejaculation in llama (*Lama glama*). *Journal of Camel Practice and Research.* 2007; 2: 203-206.
- Gillan L, Evans G, Maxwell WM. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 1997; 9: 481-487.

- Giuliano SM, Carretero MI, Gambarotta MC, et al. Improvement of llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. *Anim. Reprod. Sci.* 2010; 118 (1):98-102.
- Giuliano SM, Bisiau C, Carretero MI, et al. Use of Coomassie blue to evaluate acrosomal status in llama spermatozoa. Preliminary results. *Invet* 2012; 14(1): 279.
- Larson JL, Miller DJ. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mol. Reprod. Dev.* 1999; 52(4):445-449.
- Maxwell WMC, Johnson LA. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling or cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.* 1997; 46: 408-418.
- Neild DM, Gadella BM, Chaves MG, et al.. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology* 2003; 59: 1693-1705.

