

**EVALUACIÓN DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FITC-PSA Y FITC-PNA
PARA LA VALORACIÓN DE LA INTEGRIDAD ACROSOMAL EN
ESPERMATOZOIDES DE ALPACA**

Evaluation of different concentrations of FIT-PSA and FITC-PNA for the study of
acrosomal integrity in alpaca spermatozoa

Alejandra Ugarelli¹, Shirley Evangelista¹, Katherine Choez², Joel Pacheco², Alexei Santiani^{1,2}

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.20>

¹ *Laboratorio de Biotecnología
Reproductiva y Celular, Facultad
de Ciencias Veterinarias y
Biológicas, Universidad
Científica del Sur, Lima, Perú.*

² *Facultad de Medicina
Veterinaria, Universidad
Nacional Mayor de San
Marcos, Lima, Perú.*

E-mail: ale.ugarelli@gmail.com

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar diferentes concentraciones de FITC-PSA y FITC-PNA para valorar la integridad acrosomal en espermatozoides de alpaca. Se colectaron y congelaron 4 muestras de semen de alpaca, luego fueron descongeladas e incubadas por 1 hora a 38.5°C con 10 µg/mL de Ionóforo de calcio (Sigma-Aldrich A23187) para inducir la reacción acrosomal. Las muestras fueron divididas en 8 alícuotas e incubadas por 8 minutos a 38.5°C con: 25, 2.5, 1 y 0.5 µg/mL de FITC-PSA, así como con 10, 1, 0.5 y 0.25 µg/mL de FITC-PNA. Se evaluó la fluorescencia de la región acrosomal en cada grupo mediante un citómetro de flujo con sistema analizador de imágenes. Se realizaron controles de autofluorescencia y de viabilidad (5 µg/mL de yoduro de propidio) comparándolos con las concentraciones más adecuadas de cada una de las lectinas. Se encontró que las concentraciones de 1 µg/mL FITC-PSA y 0.5 µg/mL FITC-PNA son las más adecuadas para evaluar la integridad del acrosoma en espermatozoides de alpacas.

Palabras clave: Acrosomal integrity, alpaca, spermatozoa, FIT-PSA, FITC-PNA

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate different concentrations of FITC-PSA and FITC-PNA for the assessment of acrosome integrity in sperm alpaca. Four alpaca semen samples were collected and frozed, which were thawed and incubated for 1 hour at 38.5 °C with µg/mL Calcium ionophore (A23187) to induce

acrosome reaction. Samples were divided into 8 aliquots and incubated for 8 minutes at 38.5°C with FITC-PSA (25, 2.5, 1 and 0.5 mg/mL) and FITC-PNA (10, 1, 0.5 and 0.25 mg/mL). Acrosomal fluorescence region was assessed in each group by flow cytometry. Later, autofluorescence and viability (5 µg/ml propidium iodide) controls were compared with the most appropriate concentration of each lectin. It was found

that concentrations of 1 mg/mL to FITC-PSA and 0.5 mg/mL to FITC-PNA are best suited to evaluate the integrity of the acrosome in alpaca spermatozoa..

Keywords: Acrosomal integrity, alpaca, spermatozoa, FIT-PSA, FITC-PNA

INTRODUCCION.

La evaluación de la integridad acrosomal ha sido estudiada en distintas especies domésticas, incluidos los Camélidos Sudamericanos (CSA), por su importancia en la fecundación. Para la evaluación de la integridad acrosomal se pueden utilizar distintas técnicas como microscopía de campo claro, y microscopía de fluorescencia. La microscopía de campo claro ha sido utilizada para la evaluación acrosomal en alpacas. Así, Banda et al (2010) y Santiani et al (2005) utilizan la técnica de la Doble Tinción (Azul Tripán y Giemsa) mientras que en llamas, Fumuso et al (2015) utilizan la técnica Triple Tinción (Azul Tripán, Rojo neutro-ácido clorhídrico y Giemsa). En microscopía de fluorescencia se pueden emplear dos tipos de lectinas conjugadas al Isotiocianato de Fluoresceína (FITC): Pisum sativum (PSA) y Arachis hypogaea (PNA). El FITC-PSA se une a glucoproteínas que se encuentran en la matriz acrosomal (Celeghini et al 2010) mientras que; el FITC-PNA, se une a los terminales β -galactosa que se encuentran dentro de la membrana acrosomal externa. Estas lectinas, han sido empleadas para la evaluación acrosomal en distintas especies como en humano (Risopatron et al, 2001); porcinos (Siciliano et al 2008) y ovinos (Celeghini et al 2010).

En alpacas, Cheuquemán et al (2013) han evaluado la viabilidad e integridad de membrana acrosomal utilizando 50 μ g/mL FITC-PSA/PI, sin embargo nuestros ensayos preliminares indicaban que dicha concentración es excesiva. Por otro lado, no encontramos trabajos que utilicen FITC-PNA en espermatozoides de alpaca. Por lo tanto el objetivo de este estudio fue evaluar diferentes concentraciones de FITC-PSA y FITC-PNA para evaluar la integridad acrosomal en espermatozoides de alpaca.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de semen fueron colectadas mediante aspiración vaginal durante los meses de febrero-marzo, en la Estación Experimental del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA), ubicada en Marangani, Cusco, ubicado a 3550 msnm. Inmediatamente fueron congeladas de acuerdo al protocolo realizado por Santiani et al (2005). El descongelamiento de las muestras y la evaluación mediante citometría de flujo se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de

Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Luego del descongelamiento, las muestras fueron lavadas 2 veces por centrifugación utilizando un medio en base a Tris y posteriormente fueron incubadas durante 1 hora a 38.5°C con ionóforo de calcio (A23187) a una concentración de 10 μ g/mL. Luego, se utilizaron las lectinas de Pisum sativum (L0770, Sigma-Aldrich) y Arachis hypogaea (L-7381, Sigma-Aldrich) conjugadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA y FITC-PNA, respectivamente). Cada una de las muestras fue dividida en 8 grupos e incubadas por 8 minutos a 38.5°C con las siguientes concentraciones de las lectinas:

FITC-PSA con una concentración final de 25 μ g/mL
 FITC-PSA con una concentración final de 2.5 μ g/mL
 FITC-PSA con una concentración final de 1 μ g/mL
 FITC-PSA con una concentración final de 0.5 μ g/mL

FITC-PNA con una concentración final de 10 μ g/mL
 FITC-PNA con una concentración final de 1 μ g/mL
 FITC-PNA con una concentración final de 0.5 μ g/mL
 FITC-PNA con una concentración final de 0.25 μ g/mL

Finalmente, las muestras fueron lavadas centrifugación y evaluadas mediante citometría de flujo utilizando un equipo FlowSight (Amnis, Estados Unidos) equipado con un sistema analizador de imágenes. Se adquirieron 10 mil eventos compatibles con espermatozoides excitándolos con láser de longitud de onda de 488 nm y potencia de 20 mW. Las lecturas se realizaron en el canal 2 (Ch02) para FITC. En cada grupo se evaluó la intensidad de fluorescencia así como se registraron imágenes de cada grupo, para determinar si el fluorocromo marcaba precisamente la región acrosomal. Una vez determinada la concentración adecuada para cada una de las lectinas, se realizaron controles de autofluorescencia (sin fluorocromos) y controles de viabilidad utilizando yoduro de propidio (PI, 5 μ g/mL en muestras colocadas a 2°C por 20 minutos) como nuestros grupos controles; así como se utilizó la combinación lectina y PI. Para la lectura de PI se utilizó el canal 4 (Ch04).

RESULTADOS

Los resultados fueron evaluados de acuerdo a una escala subjetiva, donde (+++) significa mucha fluorescencia y (-) indica escasa fluorescencia. Para el caso de FITC-PSA se encontró que la concentración de 1 μ L/mL permitió observar fluorescencia verde únicamente en la región acrosomal. Concentraciones mayores emitieron un exceso de fluorescencia, mientras que 0.5 μ L/mL no permitió una adecuada visualización del acrosoma.

Del mismo modo en el Tabla 2 se observa que las concentraciones de 10 y 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de FITC-PNA emiten una excesiva fluorescencia verde, que impide identificar adecuadamente la región acrosomal. En este caso, al utilizar la concentración de 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ se puede observar adecuadamente la región acrosomal, mientras que utilizando 0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de FITC-PNA no permite evaluar adecuadamente esta característica.

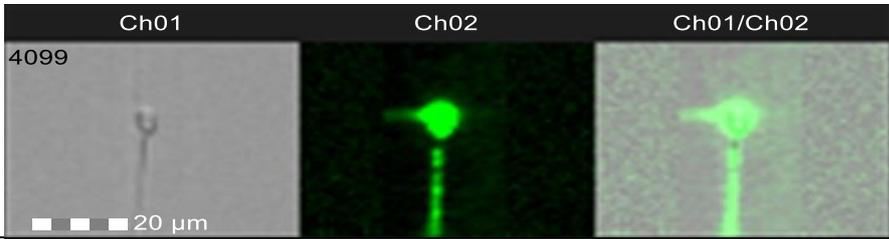
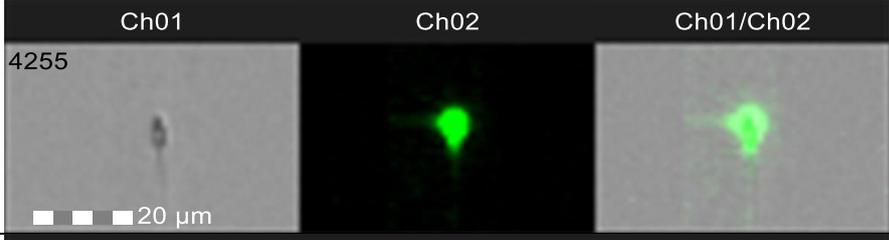
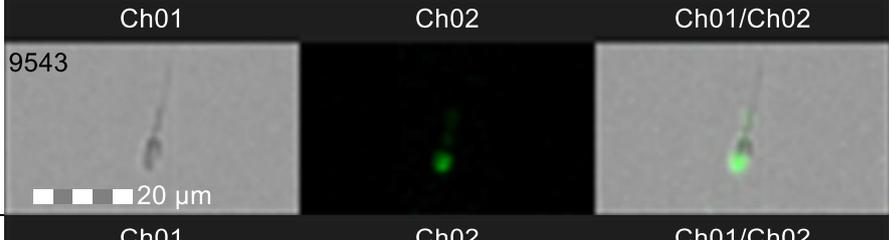
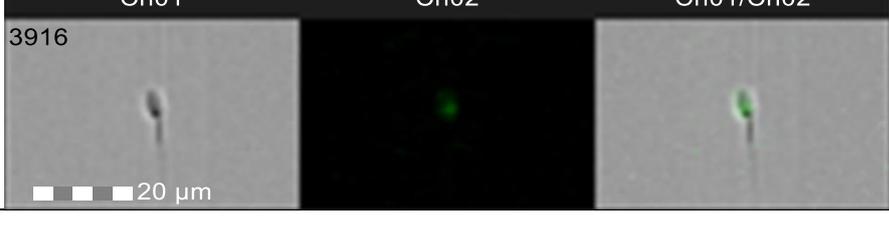
En la Figura 1 se presentan los controles de autofluorescencia, donde la mayoría de eventos están localizados en el cuadrante inferior izquierdo como se esperaría en una muestra sin fluorocromos. Del mismo modo se observa el control de viabilidad con PI, donde

la mayoría de eventos están localizados en el cuadrante inferior derecho como se esperaría de una muestra que fui inducida a muerte espermatocítica. También se presentan los gráficos de las mejores concentraciones de FITC-PSA (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y FITCPNA (0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) en donde se observa que la la lectina PNA puede marcar el daño acrosomal en una mayor cantidad de eventos en comparación con la lectina PSA. En la figura 2 podemos observar cómo queda un espermatozoide de alpaca incubado con 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de FITC-PNA junto con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PI, observándose claramente la región acrosomal y el núcleo espermático.

Tabla 1: Clasificación según fotografías de fluorescencia emitida por el FITC-PSA a distintas concentraciones: a) 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ b) 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ c) 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ d) 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Imagen			Score	Descripción		
a)	Ch01	Ch02	Ch01/Ch02	4413	+++	Fluorescencia verde intensa en toda la cabeza, cola y fondo.
b)	Ch01	Ch02	Ch01/Ch02			
c)	Ch01	Ch02	Ch01/Ch02			
d)	Ch01	Ch02	Ch01/Ch02			
1998	20 μm			++	Fluorescencia verde intensa en toda cabeza e incluso alrededor de ella.	
9599	20 μm			+	Fluorescencia verde moderada sólo en la región acrosomal.	
8029	20 μm			-	Escasa fluorescencia verde que no permite distinguir el acrosoma.	

Tabla 2: Clasificación según fotografías de fluorescencia emitida por el FITC-PNA a distintas concentraciones: a) 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ b) 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ c) 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y d) 0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Imagen			Score	Descripción
	+++	Fluorescencia verde intensa en toda la cabeza, cola y fondo.		
	++	Fluorescencia verde intensa en toda cabeza e incluso alrededor de ella.		
	+	Fluorescencia verde moderada sólo en la región acrosomal.		
	—	Escasa fluorescencia verde que no permite distinguir el acrosoma.		

DISCUSIÓN

Existen protocolos establecidos con distintas concentraciones en diferentes especies para determinar la viabilidad e integridad acrosomal del espermatozoide, por ejemplo para alpacas, según el protocolo de Cheuqueman et al (2013), la concentración trabajada de FITC-PSA fue 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esta concentración no nos permitió una adecuada evaluación de la integridad acrosomal; por lo que, fuimos reduciendo las concentraciones. En ovinos, Celeghini et al (2010), han utilizado 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FITC-PSA y en porcinos Siciliano et al (2008) utilizan 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FITC-PNA obteniendo buenos resultados. Si bien con las concentraciones que evaluamos de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FITC-PSA y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FITC-PNA permitieron separar 2 poblaciones de eventos, al analizar las imágenes de cada población comprobamos que se estaba asumiendo como daño

acrosomal, los espermatozoides que presentabas fluorescencia en toda la cabeza, la pieza media y la cola, lo que no da resultados reales. En este estudio se pudo comprobar que el exceso de fluorescencia marca todo, incluido el fondo, dando poblaciones que no son; por lo que, lo adecuado es que solo marque la zona acrosomal, que es lo que buscamos con las distintas concentraciones.

CONCLUSION

Las concentraciones de 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de FITC-PSA y 0.5 μL de FITC-PNA permiten evaluar adecuadamente el estado acrosomal en espermatozoides de alpaca.

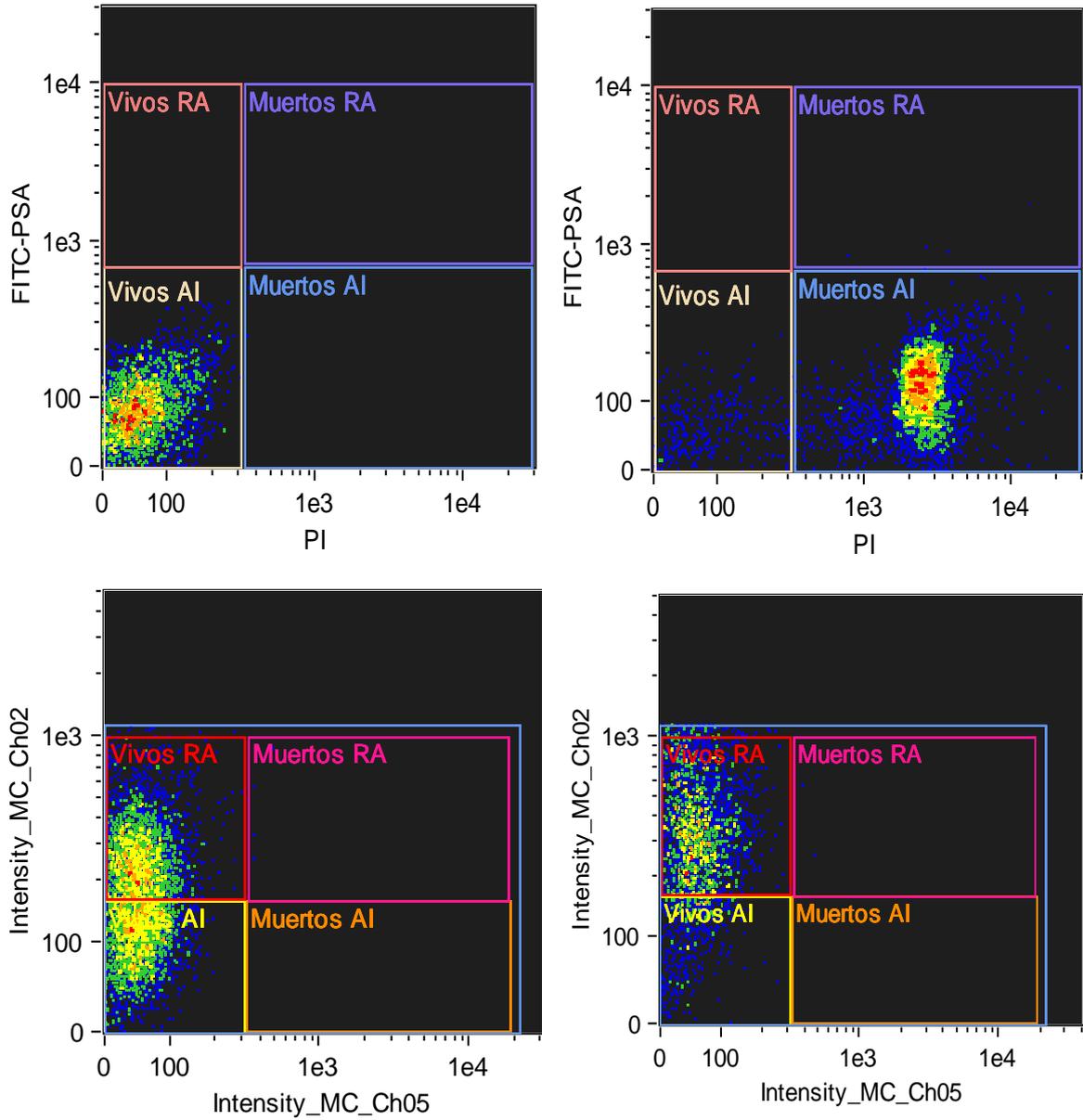


Figura 1. Controles de autofluorescencia (Figura superior izquierda); viabilidad (Figura superior derecha), FITC-PSA (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$) (Figura inferior izquierda) y FITC-PNA (0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) (Figura inferior derecha).

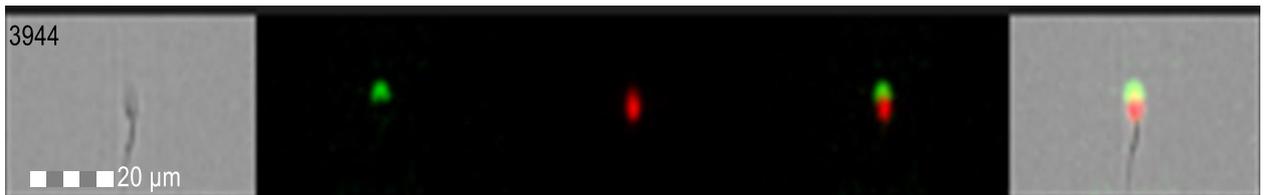


Figura 2: Imagen de un espermatozoide de alpaca con FITC-PNA/PI tomada por citometro de flujo en el que se observa claramente la zona acrosomal (verde) y la pieza media (rojo).

REFERENCIAS

- Banda J, Evangelista S, Ruiz L, Sandoval R, Rodríguez C, Valdivia M, Santiani A. Efecto de dilutores en base a tris, tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Rev Inv Vet Perú*. 2010; 21(2):145-153
- Cheuqueman C, Merino O, Giojalas L, Von Baer A, Sánchez R, Risopatrón J. Assessment of Sperm Function Parameter and DNA Fragmentation in Ejaculated Alpaca Sperm (Lama Pacos) by Flow Cytometry. *Reprod Dom Anim* 2013; 48: 447-453
- Celeghini E.C.C, Nascimento J, Raphael C.F, Andrade A.F.C, Arruda R.P Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. *Arq.Bras.Med.Vet.Zootec.*, 2010.V62, n3:536-543.
- Fumuso FG, Carretero MI, Neild D, Miragaya M, Giuliano SM. Evaluación de la viabilidad y el estado acrosomal en espermatozoides de llama (Lama glama). Resultados preliminares. *Solara* 2015; 387-389.
- Risopatrón J, Peña P, Miska W, Sánchez R. Evaluation of the acrosome reaction in human spermatozoa: comparison of cytochemical and fluorescence techniques. *Andrologia* 2001; 33:63-67.
- Santiani A, Evangelista S, Cheuquemán C, Von Baer A, Risopatrón J, Sánchez R. Evaluación de la integridad de ADN mediante citometría de flujo en espermatozoides de alpaca criopreservados con análogos de superóxido dismutasa. *Rev Inv Vet Perú*. 2012; 23(2): 182-191
- Siciliano L, Marciano V, Carpino A. Prostate-like vesicles stimulate acrosome reaction of pig spermatozoa. *Reproductive Biology and Endocrinology*.2008; 6: 1-7