ITEA (2003), Vol. Extra N.º 24. Tomo I, 321-323

# DISTRIBUCIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES SOBRE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA. EFECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN.

E. Marti, J.A. Cebrián-Pérez y T. Muiño-Blanco.
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Veterinaria.
Universidad de Zaragoza.

## INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial, como un método generalizado de reproducción en la especie ovina, no puede aportar todo su potencial sin la utilización de semen congelado. Sin embargo, la criopreservación en ovino, no ha alcanzado un desarrollo adecuado todavía y es necesaria la disponibilidad de métodos eficaces de congelación. La criopreservación ejerce un fuerte estrés oxidativo sobre las membranas del espermatozoide, lo que podría ser uno de los factores responsables de la baja capacidad fecundante de las dosis seminales ovinas congeladas. Este efecto deletéreo se podría atribuir, parcialmente, a una pérdida de la actividad de las enzimas responsables de la defensa antioxidante que están presentes en el espermatozoide ovino. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue conocer la actividad y distribución sobre la membrana espermática de Superóxido dismutasa (SOD), Glutation peroxidasa (GPx) y Glutation reductasa (GRD), así como la posible pérdida y/o modificación de las mismas asociada al manejo y a la criopreservación de los espermatozoides.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó semen ovino obtenido a partir de moruecos de raza *Rasa Aragonesa* pertenecientes a ANGRA, realizándose extracciones semanales, con períodos de abstinencia de dos o tres días.

El diluyente utilizado se añadió en dos fracciones. La fracción 1 se preparó añadiendo 5% de yema de huevo (v/v) y antibióticos (45.000 UI de Penicilina y 0.4 g de Estreptomicina/100 ml) a la leche. Para preparar la fracción 2 se añadieron a la leche la misma cantidad de yema de huevo y de antibióticos, y 14% de glicerol (v/v) y galactosa 224mM. La rampa de descenso de la temperatura fue de 0.4ºC/min, hasta los 5ºC. La fracción 2 se añadió a lo largo del proceso de equilibrado posterior. Tras el empajuelado se almacenaron en nitrógeno líquido a –196ºC. Las muestras se descongelaron en un baño a 37ºC durante 30s y se procesaron. El aditivo estudiado fue: proteínas del plasma seminal ovino (7 mg/ml) junto con vitamina E acetato (1mM) y una mezcla comercial de los ácidos grasos oleico y linoleico (25 μM). En cada experimento se congelaba una muestra control, con el diluyente sin ningún aditivo.

La extracción y el estudio de la actividad enzimática se realizó según el método descrito por Martí, J.I. y cols. [1].

La inmunodetección de las enzimas sobre la superficie espermática se hizo mediante inmunofluorescencia indirecta [2]. Las células se fijaron con formaldehído tras lo que se bloquearon con BSA las posibles regiones de unión inespecífica. A continuación se incubaron con el anticuerpo primario y con el anticuerpo secundario marcado con fluorescencia, consecutivamente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inicialmente la capacidad protectora y antioxidante está en la propia célula y en el plasma seminal, de modo que en todos los casos, la actividad de las muestras "frescas" que contenían aditivos fue mayor debido a que se añadieron proteínas del plasma seminal ovino (PPS) entre las que se encuentran las enzimas estudiadas.

La actividad de la GRD [fig.1A] disminuyó con la refrigeración y se mantuvo con la congelación. El descenso de actividad fue mayor que en la muestra control. Esto podría deberse a que hay una mayor protección con los aditivos y, por tanto, la extracción es menor, es decir, hay un daño menor de la membrana plasmática cuando se utilizan los aditivos. En las imágenes de inmunodetección observamos que la muestra control refrigerada presentó un patrón de marcaje [fig.1B] similar al de la muestra fresca mostrando la fluorescencia distribuida en el flagelo, sin

embargo, las muestras congeladas presentaron fundamentalmente dos tipos de marcaje: unos con la región postacrosomal y otros con toda la superficie levemente marcada. En las muestras frescas, que tienen aditivos, parte de los espermatozoides presentaban marcaje en toda la superficie, algunos con la región postacrosómica y el flagelo marcados y otros que únicamente tenían fluorescencia en el flagelo. Las muestras refrigeradas y congeladas, sin embargo, mostraron una distribución de la fluorescencia por toda la superficie de modo que los aditivos, podrían estar ejerciendo un efecto protector que evitara en parte el daño por frío de la membrana.

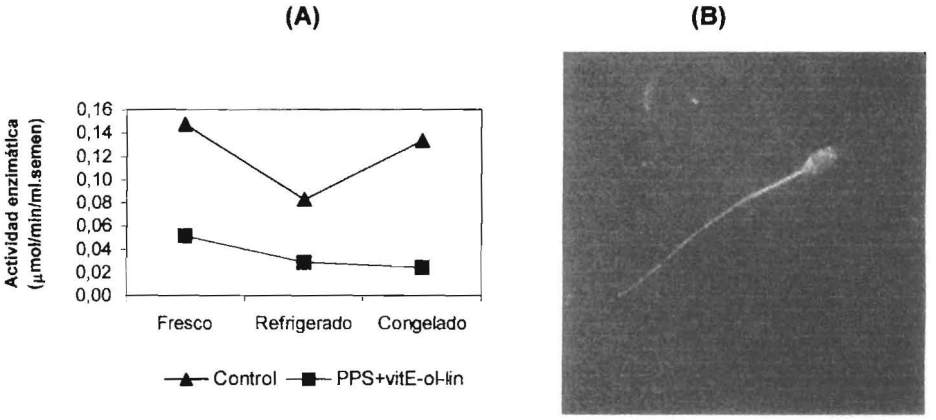



**Figura 1: A) Actividad enzimática de GRD durante la criopreservación. B) Modelo de distribución de GRD en la superficie espermática mediante microscopía confocal.**

La actividad de la enzima GPx [fig.2A] no se modifica sustancialmente por la criopreservación. Sin embargo, puesto que la GRD aporta el sustrato requerido por la GPx para eliminar especies reactivas de oxígeno (ROS), y ésta se mantiene mejor cuando se utilizan aditivos en el medio de congelación, la GPx se beneficia de forma indirecta de la presencia de los mismos. Los resultados obtenidos mediante inmunodetección [fig.2B] coinciden con la actividad constante a lo largo de la congelación ya que se obtienen resultados similares en las muestras control y en las que tienen aditivos. En todos los casos las poblaciones más abundantes corresponden a un marcaje de la región postacrosómica de algunos espermatozoides y de toda la superficie en otros.

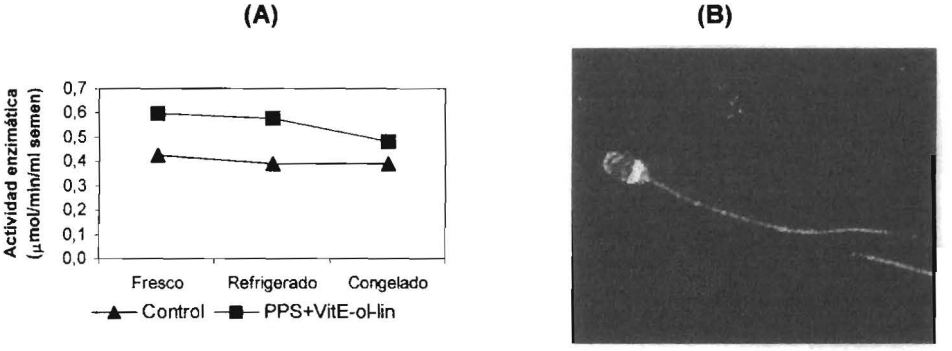



**Figura 2: A) Actividad enzimática de GPx durante la criopreservación. B) Modelo de distribución de GPx en la superficie espermática mediante microscopía confocal.**

En el caso de la SOD [fig.3A], el incremento obtenido en semen refrigerado podría ser debido a que aumenta la cantidad de enzima que se puede extraer de la célula

por el daño provocado por la refrigeración. Tras la congelación se produce una disminución de la actividad de la enzima lo que podría deberse a dos cosas: a que la enzima se desnaturaliza, de modo que aunque se extraiga más hay parte inactiva, o a que la enzima se pierde a lo largo del proceso.
Los resultados obtenidos con el estudio paralelo de la inmunodetección [fig.3B] indicarían que la enzima sigue estando presente en la superficie espermática tras el proceso de criopreservación, por tanto, no hay pérdida de la misma [2] sino inactivación con la temperatura. Mientras en las muestras control hay una pequeña redistribución de la enzima sobre la superficie de los espermatozoides durante la refrigeración y un cambio profundo de dominios mediante la congelación, en las muestras con aditivos no hay una variación apreciable de subpoblaciones a lo largo del proceso, indicando que los aditivos empleados contribuyen a la estabilización de los dominios de membrana, al menos para esta enzima.

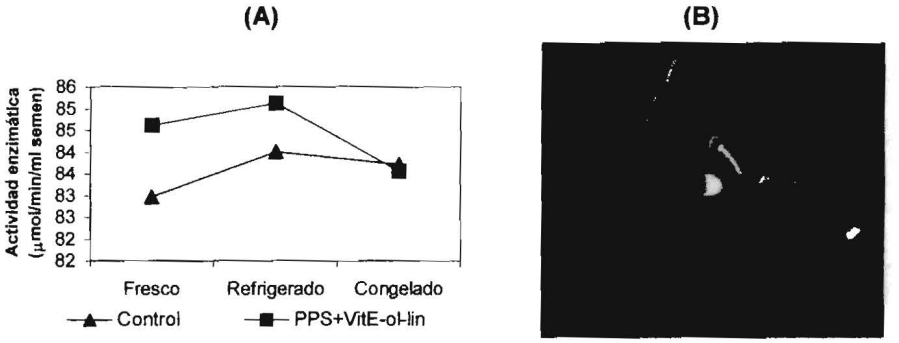



**Figura 3: A) Actividad enzimática de SOD durante la criopreservación. B) Modelo de distribución de SOD en la superficie espermática mediante microscopía confocal.**

Los datos, por tanto, parecen indicar que en la transición de fase que se produce durante el enfriamiento [3], hay una redistribución de todas las enzimas en la membrana del espermatozoide, sin embargo, la presencia de aditivos protegería en cierta medida al espermatozoide del ataque de las ROS.

La microscopía confocal nos permitió ver además que todas las enzimas estaban presentes también en el interior de la célula. Nuestros resultado coinciden con los de Kinnula y cols. (1995) [4] que demostraron la existencia de GRD en el citoplasma y en la mitocondria de las células además de existir una fracción extracelular. Esta enzima colocaliza con la GPx ya que son enzimas complementarias [5, 6, 7].

Por último encontramos tres isoenzimas de la SOD distribuidas en: citoplasma y núcleo [8, 9], matriz mitocondrial [9] y una parte extracelular [9, 10]

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Martí, J.I. y cols., ITEA, IX Jornadas producción Animal, 2001, 22(2): 853-855.
[2] Lasso, J.L. y cols., J. Androl, 1994, 15(3): 255-265.
[3] Holt, W. y col., J. Reprod. Fértil., 1986, 78: 447-457.
[4] Kinnula, V.L. y cols., Lab. Invest., 1995, 73: 3-19.
[5] Buettner, G.R., Antioxidant enzymes and functions. Naturally occurring antioxidants. Oxygen, 1998, Washington DC, USA. 1:1-20.
[6] Takahashi, K. y cols., Arch. Biochem. Biophys., 1987, 256: 677-686.
[7] Yoshimura, S. y cols., Gene, 1994, 145: 293-297.
[8] Crapo, J.D. y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89: 10405-10409.
[9] Fridovich, I. y cols., J. Exp. Biol., 1998, 201: 1203-1209.
[10] Tibell, L. y cols., Arch. Biochem. Biophys., 1993, 304: 429-433.

*** Este trabajo ha sido financiado por las ayudas CICYT AGL 2000-1221 y CICYT-FEDER AGL 2002-00097.**