EFECTO DE LA REFRIGERACIÓN Y LA CONGELACIÓN EN LA ESTRUCTURA NUCLEOPROTEICA DEL ESPERMATOZOIDE PORCINO

Flores, E., Medrano, A., Ramió-Lluch, L., Rodríguez-Gil, J.E.
Unidad de Reproducción Animal, Departamento de Medicina y Cirugía Animales, Facultad de Veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona.
Eva.flores@uab.es

INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides porcinos son muy sensibles al proceso de congelación-descongelación. Diferentes fases del proceso de criopreservación son potencialmente perjudiciales para el espermatozoide, como los lavados, las diluciones, los cambios de temperatura y los cambios osmóticos. En este proceso, el espermatozoide porcino sufre una serie de daños a nivel de la membrana plasmática, el DNA y otros orgánulos celulares como resultado del estrés osmótico, el shock térmico y la formación de hielo intracelular (Guthrie y Welch, 2005).

La evaluación de la integridad del DNA espermático es de gran interés ya que la intensidad de fragmentación del DNA se ha correlacionado con problemas de desarrollo embrionario. Espermatozoides con DNA dañado son aparentemente normales y son capaces de fecundar un ovocito, pero fracasan en el desarrollo embrionario (Silva y Gadella, 2006). Es por esto que se debe estudiar a fondo la integridad del DNA del espermatozoide.

El DNA de las células espermáticas maduras se encuentra fijado por la presencia de protaminas entre su estructura helicoidal. Las protaminas son proteínas básicas y pequeñas, ricas en arginina, que se unen al DNA y lo estabilizan mediante puentes disulfuro. La estabilización del núcleo espermático tiene lugar durante la espermiogénesis en dos fases. En una primera fase, las histonas son sustituidas por proteínas nucleares de transición. Y en la segunda fase, las protaminas sustituyen a las proteínas de transición, revistiendo el DNA y reempaquetándolo de manera muy condensada. Las protaminas son las proteínas clave involucradas en el empaquetamiento final del DNA del espermatozoide, y un proceso adecuado estabiliza el DNA y lo hace menos vulnerable al daño oxidativo.

El objetivo del trabajo fue estudiar el efecto de la refrigeración y la congelación en la estructura nucleoproteica del espermatozoide porcino.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este estudio se utilizaron dosis seminales porcinas refrigeradas a 16ºC. Estas dosis se sometieron a un proceso de congelación y descongelación. El medio de congelación utilizado fue el descrito por Kikuchi *et al.* (1998) que consiste en dos fracciones NSF-I (80% β-lactosa de 310 mM, 20% yema de huevo, 80 mg/L kanamicina) y NSF-II (92,5% NSF-I, 1,5% Equex Stem, 6% glicerol). La primera fase del protocolo de congelación consistió en diluir los espermatozoides con NSF-I y bajar la temperatura de 16ºC a 5ºC en unas 2 h. Una vez a 5ºC el semen se rediluyó con el medio NSF-II para obtener una concentración 1×10^9 espermatozoides/mL y se envasó en pajuelas de 0,5 mL. La congelación de las pajuelas se hizo con un sistema automático en biocongelador programable (Computer Controlled Rate Freezer ICeCube 14S). La tasa de bajada de temperatura de 5ºC a -5ºC fue de 6ºC/min, de -5ºC a -80ºC de 40ºC/min, a -80ºC se mantuvo durante medio minuto, y de -80ºC a -150ºC fue de 60ºC/min. Una vez las pajuelas estuvieron a -150ºC, se introdujeron en un tanque de nitrógeno líquido hasta el momento de procesarlas. La descongelación de las pajuelas se hizo introduciéndolas rápidamente en un baño a 37ºC durante unos 20 segundos.

Para realizar el Western Blott se cogieron alícuotas de las muestras seminales en los tres puntos de estudio (fresco, refrigerado a 5ºC y congelado-descongelado) y se centrifugaron a 600 *g* durante 10 min. El sobrenadante se descartó y los sedimentos se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS). Los sedimentos obtenidos se congelaron rápidamente con nitrógeno líquido y se guardaron a -80ºC hasta el momento de procesarlos.

Los sedimentos se descongelaron y se resuspendieron en el tampón de homogeneización compuesto por 10 mM de Tris-HCl, 15 mM de etilendiaminotetraacético (EDTA), 150 mM de KF, 0,6 M de sacarosa, 14 mM de β-mercaptoethanol, 10 µg/mL de leupeptina, 1 mM de benzamidina y 1 mM de fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF), y se homogeneizaron por sonicación. A continuación, los homogenados se centrifugaron durante 15 min a 10.000 *g*. Se recogieron los sobrenadantes y se midió la concentración de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976). Las muestras se dividieron en dos, y una parte se digirió con 40 µg/mL de DNasa I durante 2 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se diluyeron las muestras, tanto las digeridas con DNasa I como las no digeridas, a 1:5 con el tampón de carga 5× que consiste en una solución de 250 mM de Tris (pH 6,8), 50 mM de ditiotreitol (DTT), 10% de dodecil sulfato sódico (SDS), 0,5% de Azul de Bromofenol y 50% de glicerol. Finalmente, las muestras se hirvieron durante 3 min y se conservaron a -20ºC hasta el momento de cargarlas en el gel de electroforesis.

Se realizó una SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) con un gel de carga al 4% y un gel separador al 10% de acrilamida. Se cargaron un total de 20 µg de proteína en un gel de 0,75 mm. El tampón de electroforesis usado consistía en 192 mM de glicina, 25 mM de tris y 0,1% de SDS (pH 8,5), y se corrió a 170 V. A continuación se hizo una transferencia en membrana de nitrocelulosa a 100 V durante 45 min con un tampón de transferencia que consistía en 192 mM de glicina, 25 mM de tris y 20% de metanol. Seguidamente las membranas se bloquearon con el tampón de bloqueo que consistía en tampón tris salino con 0,05% de Tween-20 (TBST) y 3% de albúmina sérica bovina (BSA) durante 30 min a temperatura ambiente. Después se incubaron con el anticuerpo primario Protamina-1 diluido 1:1000 con tampón de bloqueo, y se dejaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se realizó un control negativo incubando la membrana con el anticuerpo primario preincubado con el péptido de bloqueo durante 2 h a concentración 1:15. Pasado este tiempo se hicieron tres lavados de 5 min con TBST y se incubaron con el anticuerpo secundario específico antisuero de cabra conjugado con peroxidasa diluido 1:2000 en tampón de bloqueo. La presencia de proteína se observó mediante el uso del sistema de detección ECL-Plus y la exposición con películas fotográficas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El patrón de bandas de Protamina-1 obtenido mediante Western Blott de eyaculados frescos porcinos se vió alterado por la refrigeración y la congelación. En espermatozoides frescos se observaron 4 bandas específicas de aproximadamente 200 kDa, 50 kDa, 35 kDa y 25 kDa. La refrigeración de las muestras de 16ºC a 5ºC provocó un cambio en este patrón de bandas, dando lugar a 3 bandas de aproximadamente 200 KDa, 90 KDa y 65 KDa. La posterior congelación y descongelación de estos espermatozoides no originó nuevos cambios, manteniéndose este patrón de 3 bandas.

La digestión de los espermatozoides con DNasa I provocó un cambio sustancial en el patrón de bandas tanto de los eyaculados frescos como de los refrigerados y los congelados-descongelados. Este cambio observado se debe al hecho de que en nuestro protocolo no existe ninguna fase de purificación de las proteínas nucleares, y la homogeneización de las muestras no fue muy agresiva. Por lo tanto, las bandas que

obtuvimos no corresponden a la protamina aislada, sino que son agregados de DNA y protamina, ya que la digestión con DNasa I causó un cambio en el patrón de bandas.

Estos resultados sugieren que la congelación-descongelación de los espermatozoides porcinos induce una alteración en la interacción DNA/Protamina-1, y esta alteración se inicia en la fase de refrigeración de 16ºC a 5ºC.

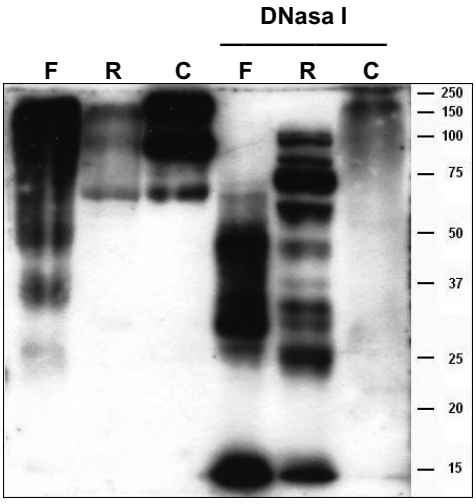


Figura 1. Patrón de bandas de Protamina-1 obtenido mediante Western Blott. F= Fresco; R= Refrigerado; C= Congelado.

BIBLIOGRAFIA

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Guthrie HD, Welch GR. 2005. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology* 63: 396-410.

Kikuchi K, Nagai T, Kashiwazaki N, Ikeda H, Noguchi J, Shimada A, Soloy E, Kaneko H. 1998. Cryopreservation and ensuing in vitro fertilitzation ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4ºC. *Theriogenology* 50: 615-623.

Silva PFN, Gadella BM. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65: 958-978.