ESTATUS MITOCONDRIAL Y PRODUCCIÓN DE RADICALES SUPERÓXIDO TRAS LA SELECCIÓN ESPERMÁTICA POR *ANDROCOLL* DE ESPERMATOZOIDES DESCONGELADOS DE CIERVO Y DE OVINO

Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Campillo, I., Palacios-Aguado, A., Fuertes, C., Redondo-Blanco, S., Alonso-Molero, J. y Martínez-Pastor, F.

INDEGSAL, Universidad de León, 24071 León, España. felipe.martinez@unileon.es

INTRODUCCIÓN

Los bancos de recursos genéticos son básicos tanto para la selección de razas agropecuarias como para la conservación de especies domésticas o silvestres (Roldán et al., 2006; Andrabi y Maxwell, 2007). Si bien los esfuerzos han de centrarse en conservar la mejor calidad posible de las muestras congeladas, existen alternativas de mejora seminal post-descongelación, como los gradientes de selección espermática. Tanto en animales domésticos como silvestres, la técnica se ha usado mayoritariamente para fines de diagnóstico. Otra aplicación, sin embargo, es la de seleccionar sólo espermatozoides más resistentes. Por lo tanto, el principal fin de estos gradientes es el de minimizar el efecto perjudicial de una serie de cambios sufridos por los espermatozoides durante la conservación, como daños oxidativos y envejecimiento prematuro, lo que contribuye a la muerte espermática y a la reducción de la supervivencia de los que resisten el proceso (Watson, 2000).

La utilización de estos gradientes ha supuesto la mejora de la supervivencia espermática, así como la preservación de la integridad del ADN (Morrell et al., 2009), posiblemente mediante la eliminación de radicales libres del medio y la separación de los espermatozoides susceptibles de generarlos. Hay que tener en cuenta que los daños producidos tanto en el proceso de refrigeración como en la congelación han sido relacionados con la generación de estrés oxidativo (Stradioli et al., 2007). Una producción excesiva de estos radicales, no sólo puede causar daños directos debido al estrés oxidativo, sino también por la desregulación de procesos como la capacitación. No obstante, los radicales libres son importantes para la regulación de la fisiología espermática, con lo cual podríamos esperar que los espermatozoides más adecuados fuesen capaces de mantener un cierto nivel de producción de radicales libres.

Por lo tanto, debido a que los radicales libres participan en numerosas vías de señalización intracelular, el presente estudio trata de observar la variación de la presencia del radical superóxido, así como el estatus mitocondrial en espermatozoides de carnero y ciervo rojo, llevar a cabo una centrifugación a través de un gradiente en capa simple, desarrollado específicamente para ovino (Androcoll-O™).

MATERIAL Y MÉTODOS

Los reactivos generales fueron comprados a Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.), y los fluorocromos fueron comprados a Invitrogen (Carlsbad, CA, EE.UU.). Utilizamos dosis seminales de carneros y muestras epididimarias de ciervo, congeladas en medio Tris-citrato-fructosa (20% yema de huevo y glicerol: ovino 4%, ciervo 8%), a 10^8 espermatozoides/ml. En cada sesión experimental se descongelaron 3 dosis (37 ºC 30 s), que se mezclaron y se diluyeron a 50×10^6 ml^{-1} con medio TALP-Hepes. La muestra se dividió entre dos tubos: 40 millones en los tubos de Androcoll-O™ (SLU, Uppsala, Sweden) para su selección y el resto (10^7 ml^{-1}) se mantuvo como control. Los tubos con Androcoll-O se centrifugaron a 600xg 20 minutos. La interfase (espermatozoides muertos y dañados) se pasó a otro tubo, y el pellet se ajustó a 10^7 ml^{-1} con TALP-Hepes.

Inmediatamente después de la selección por Androcoll, se tomó una alícuota de cada tubo y se diluyó a 10^6 ml^{-1} en PBS para su análisis mediante citometría de flujo. Para determinar la presencia del radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) en las mitocondrias, los espermatozoides se incubaron con 5 µM de *MitoSOX Red*, 100 nM de YOPRO1, para discriminar los espermatozoides muertos/membrana alterada, y 100 nM de *Mitotracker Deep Red*, para determinar la actividad mitocondrial. Los tubos se incubaron 15 min a 37 ºC, añadiendo 2,5 µg/mL de Hoechst 33342 para identificar contaminantes (*debris*). El análisis se realizó con un citómetro de flujo CyAn ADP, provisto de tres lásers de diodos (405 nm —violeta—,

488 nm —azul— y 635 nm —rojo—). La fluorescencia fue recogida por fotodetectores provistos de filtros 450/50 (láser violeta, fluorescencia azul: Hoechst 33342), 530/40 (láser azul, fluorescencia verde: YOPRO1), 613/20 (láser azul, fluorescencia roja: ioduro de propidio y MitoSOX) y 665/20 (láser rojo, fluorescencia roja: Mitotracker). El mismo análisis se repitió tras 1 h a 37 ºC. Este experimento se replicó 5 veces, y los datos se analizaron con el paquete estadístico R (http://www.r-project.org), utilizando modelos lineales de efectos mixtos (efectos fijos: incubación y tratamiento gradiente selección; efectos aleatorios: replicado).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio hemos utilizado dos mediciones diferentes de las funciones mitocondriales: la sonda MitoSOX (figura 1) para evaluar la generación de radical superóxido y el Mitotracker Deep Red para determinar la actividad mitocondrial.

Los espermatozoides de ovino (Tabla 1) proporcionaron una calidad baja tras la descongelación (Control 1 h) pero, gracias a la utilización del gradiente, se obtuvo un incremento significativo para este valor en los espermatozoides seleccionados. Además, la proporción de viables capaces de generar radical superóxido fue significativamente superior. En cambio, la proporción de viables con mitocondrias activas no fue superior en los espermatozoides seleccionados. Todos los parámetros valorados resultaron inferiores en la interfase, Mostrando la efectividad del Androcoll para separar los espermatozoides dañados en el proceso de congelación/descongelación. Tras la incubación, las diferencias observadas entre el Control y los espermatozoides seleccionados disminuyeron, no encontrando diferencias significativas.

En las muestras de espermatozoides epididimarios de ciervo rojo (Tabla 2) obtuvimos igualmente una proporción mayor tanto de espermatozoides viables como de viables con las mitocondrias activas. No obstante, en esta especie no obtuvimos un incremento de la proporción de viables con producción alta de superóxido. Tal vez esta diferencia se deba al origen de las muestras (epidídimo) o a una mayor resistencia al proceso de congelación/descongelación, representando esa población de viables con niveles de superóxido altos una fracción estresada de los espermatozoides que han sobrevivido a la descongelación en buenas condiciones (Watson, 2000). La interfase contenía una población con mucha menos viabilidad y mitocondrias activas, aunque la proporción de viables con superóxido alto fue igualmente baja. No obstante, la viabilidad en la interfase fue superior a la observada en ovino. Esto podría indicar que las condiciones del gradiente podrían ser demasiado estrictas, pero la proporción de espermatozoides con mitocondrias activas parece descartar esa posibilidad, sugiriendo más bien que el gradiente realiza una buena separación. Tras la incubación, las diferencias se mantuvieron, pero la calidad siguió siendo superior en las muestras seleccionadas, y la producción de superóxido se mantuvo baja.

Hemos observado claras diferencias entre las dos especies analizadas en este estudio, teniendo en cuenta que los espermatozoides tienen diferente origen para cada especie y que quizá la respuesta en descongelación de los espermatozoides de ovino pueda ser diferente en caso de ser de origen epididimario. Es probable que existan daños sub-letales en los espermatozoides seleccionados de ovino, los cuales se magnifiquen al llevar a cabo la incubación durante 1 h a 37 ºC. En cambio, los resultados en ciervo indican una mejor resistencia a la incubación, no solo de los seleccionados, sino también del control.

Por lo tanto, el coloide Androcoll-O™ sería una buena opción para realizar la selección de espermatozides descongelados de pequeños rumiantes. Nuestros resultados indican un efecto muy favorable en espermatozoides epididimarios de ciervo y unos resultados ambiguos en los de ovino, atendiendo a la producción de superóxido y a la poca resistencia a la incubación. Es posible que en ovino los espermatozoides sean más vulnerables a la dilución, centrifugación e incubación, indicando que habría que mejorar los protocolos de criopreservación. En conclusión, el Androcoll-O™ permite seleccionar una subpoblación con unos parámetros fisiológicos de calidad mejorados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Andrabi, S. M. H., Maxwell, W. M. C. 2007. *Anim Reprod Sci* 99: 223-243.• Morrell, J.M., Dalin, A.M., Rodríguez-Martínez, H. 2009. *Equine Vet J* 41: 53-58.• Roldan, E. R. S., Gomendio, M., Garde, J. J., Espeso, G., Ledda, S., Berlinguer, F., del Olmo, A., Soler, A. J.,

Arregui, L., Crespo, C., González, R. 2006. *Reprod Domest Anim* 41 Suppl. 2: 82-92.• Stradioli, G., Noro, T., Sylia, L., Monaci, M. 2007. *Theriogenology* 67: 1249-1255.• Watson P.F. 2000. *Anim Reprod Sci* 60–61: 481-492.

Agradecimientos: Financiado en parte por AGL2010-15758 (MICINN) y LE019A10-2 (Junta de Castilla y León). F. Martínez Pastor es beneficiario de un contrato del programa Ramón y Cajal (RYC-2008-02560, MICINN, España).

Tabla 1. *Proporción de espermatozoides descongelados de carnero en distintas poblaciones (Viables: YO-PRO-1–; $O_2^{\bullet-}$ alto/bajo: viables con fluorescencia de MitoSOX alta/baja (nivel de superóxido alto/bajo); MT+/-: viables con fluorescencia de Mitotracker alta/baja (mitocondrias activas/inactivas).Diferentes letras indican diferencias significativas en cada fila de datos.*

	0 h			1 h	
	Control	Interfase	Seleccionados	Control	Seleccionados
Viables	29,0±0,4a	8,0±1,3b	50,3±5,6c	11,2±1,6	15,11±3,4
$O_2^{\bullet-}$ alto	11,5±3,0a	2,7±1,9b	24,7±2,6c	4,4±1,6	5,13±1,6
$O_2^{\bullet-}$ bajo	17,4±2,6a	5,0±2,5b	25,7±8,0ª	6,8±3,1	9,98±4,7
MT+	18,8±2,7a	4,9±0,4b	28,4±7,6ª	7,5±0,9	9,86±4,3
MT-	10,0±2,4a	3,3±1,2b	21,7±2,6c	3,8±1,0	5,23±0,9

Tabla 2. *Proporción de espermatozoides descongelados de ciervo rojo en distintas poblaciones (Viables: YO-PRO-1–; $O_2^{\bullet-}$ alto/bajo: viables con fluorescencia de MitoSOX alta/baja (nivel de superóxido alto/bajo); MT+/-: viables con fluorescencia de Mitotracker alta/baja (mitocondrias activas/inactivas). Diferentes letras indican diferencias significativas en cada fila de datos.*

	0 h			1 h	
	Control	Interfase	Seleccionados	Control	Seleccionados
Viables	56,7±2,95a	38,0±2,1b	86,4±1,3c	31,7±3,2ª	53,7±3,7b
$O_2^{\bullet-}$ alto	4,6±0,64	6,8±1,1	7,4±2,2	6,2±0,7	4,6±1,0
$O_2^{\bullet-}$ bajo	52,1±3,42a	31,2±2,2b	78,9±3,5c	25,5±3,8ª	49,1±4,2b
MT+	24,0±2,30a	5,9±2,3b	49,5±3,2c	20,0±1,5ª	33,7±2,6b
MT-	32,8±4,87	32,7±2,4	36,8±2,2	11,7±2,2	20,1±4,5

MITOCHONDRIAL STATUS AND ROS PRODUCTION AFTER ANDROCOLL SELECTION OF THAWED RAM AND RED DEER SPERM

ABSTRACT: Genome resource banks are the base for domestic and wild species genetic selection, so it is important to focus in achieving the highest quality on the samples we preserve. Although that is not always possible we have alternatives to improve post-thawing semen quality such as sperm selection gradients. They aim to minimize the damage that cryopreservation causes in the sperm cells. In this study we have tested the Androcoll single layer centrifugation gradient with the objective of observing its utility on post-thaw semen samples of ram and red deer within an hour of incubation at 37 ºC. We have also tested the presence of mitochondrial superoxide with the fluorescent probe MitoSOX. We use a pool of 3 males from each species. The gradient increased significantly the quality of the post-thawed samples, obtaining a higher number of active mitochondria on the selected population compared to the control. Regarding the incubation we found differences between the species. For red deer samples we found a significant improvement in viability and active mitochondria results that we did not found with the ram samples after 1 hour of incubation.

Keywords: ram, red deer, Androcoll, MitoSOX.