

# PRESENCIA DE CASPASAS 3 Y 7 ACTIVAS EN ESPERMATOZOIDES DE CERDO CRIOPRESERVADOS\*

\*Morales ECL<sup>1</sup>, Vázquez AJF<sup>2</sup>, Gutiérrez PO<sup>1</sup>.

CEIEPP, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México<sup>1</sup>.

CUT, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México<sup>2</sup>.

**Palabras claves:** congelación-descongelación, caspasas 3 y 7 activas, viabilidad espermática, trehalosa  
artrimy@yahoo.com.mx

## Introducción

La identificación de los marcadores apoptóticos en los espermatozoides de las diferentes especies domésticas se ha relacionado con la fertilidad y se propone su detección como una manera de fortalecer la evaluación brindada por el espermograma<sup>1,2</sup>. En espermatozoides de cerdo se ha reportado la presencia de caspasas 3 y 7 activas y de sus substratos, pero se desconoce su función<sup>1,2</sup>.

La congelación de semen porcino es limitada debido a la susceptibilidad de la membrana citoplasmática del espermatozoide al proceso<sup>3</sup>. En los medios de congelación la adición de trehalosa se ha utilizado como un estabilizador de membrana que potencializa el efecto crioprotector del glicerol<sup>4</sup>, disminuyendo el daño acrosomal, manteniendo la movilidad y la viabilidad espermática<sup>4</sup>. El presente estudio comparó la motilidad, la integridad de la membrana y la expresión de caspasas 3 y 7 activas en espermatozoides porcinos frescos y criopreservados en un medio a base de trehalosa.

## Material y Métodos

Se evaluaron eyaculados de dos sementales con fertilidad probada, pertenecientes al CEIEPP de la FMVZ, UNAM. Se realizó el espermograma de rutina y se congelaron en un grupo control (Androstar<sup>R</sup> CryoPlus, Minitube) y otro experimental (Trehalosa, 300 mM). Antes y después de la congelación se valoró la motilidad por observación directa y los espermatozoides de los diferentes grupos se incubaron con los fluorocromos SYBR-14 /IP para confirmar viabilidad/mortalidad espermática y FLICA/IP para la detección de caspasas 3 y 7 activas/mortalidad espermática (Invitrogen, Molecular Probes, Inc. Eugene .OR). Las evaluaciones se realizaron mediante el microscopio de Fluorescencia VELAB a 40x, y se contaron un mínimo de 200 células por prueba. La descongelación se realizó a los 15 días de criopreservación.

## Resultados y Discusión

La adición de trehalosa mantuvo una mayor motilidad en comparación al grupo control, pero sin diferencia estadística ( $P>0.05$ ) (Cuadro 1). Se propone lograr una valoración más objetiva con la utilización del Sistema de Análisis Asistido por Computadora (CASA), para un análisis más preciso de los diferentes patrones de motilidad y ver si presentan diferencias significativas entre estos. El grupo trehalosa mostró menor viabilidad aparente al descongelado que el grupo control pero sin significancia ( $P>0.05$ ). Además hubo una discrepancia entre los espermatozoides móviles y vivos al descongelado que se interpreta como la presencia de un mayor número de espermatozoides vivos pero no móviles en el grupo trehalosa. El porcentaje de espermatozoides

con presencia de caspasas 3 y 7 activas (Figura 1), incrementó significativamente al descongelado y estos resultados concuerdan con los reportados en un estudio realizado en espermatozoides de humano<sup>5</sup>.

## Cuadro 1: Motilidad, Viabilidad y Expresión de Caspasas 3 y 7 activas en espermatozoides de cerdo frescos y descongelados.

Media  $\pm$ de. Diferentes literales en las mismas columnas indican una diferencia significativa obtenida por ANOVA seguida por TUKEY ( $P<0.05$ ).

Txs.	Porcentaje de espermatozoides frescos				Porcentaje de espermatozoides descongelados			
	Mot.	SYBR-14	FLICA	IP	Mot.	SYBR-14	FLICA	IP
	Inicial	+	+	+	Inicial	+	+	+
Control	80	82.48 $\pm 0.13^a$	35.77 $\pm 0.97$	17.44 $\pm 0.10^a$	21.67 $\pm 6.83$	67.46 $\pm 1.60$	55.1 $\pm 0.70^a$	32.76 $\pm 1.72^a$
Trehalosa	80	84.29 $\pm 0.43^b$	35.07 $\pm 1.60$	16.63 $\pm 0.50^b$	28.33 $\pm 2.58$	60.09 $\pm 3.30$	53.56 $\pm 0.77^b$	42.13 $\pm 2.92^b$

## Conclusiones

La trehalosa mantiene un mayor número de espermatozoides vivos antes de la congelación a comparación del grupo control ( $P>0.05$ ) pero este número no coincide con los espermatozoides vivos al descongelado, esto indica que existen espermatozoides vivos pero no móviles que podrían mantener su movilidad si se mejora el protocolo de criopreservación. Una propuesta es lograr difundir la trehalosa al medio intracelular mediante alternativas como la utilización de liposomas cargados con este disacárido. El incremento de las caspasas y de espermatozoides muertos en este estudio sugiere que los marcadores apoptóticos podrían indicar que dichas caspasas pueden involucrarse en el proceso de criodañó celular del espermatozoide congelado, por lo que se sugiere explorar esta teoría mediante la identificación del substrato PARP dividido que comprobaría la función de las caspasas 3 y 7 activas durante el proceso.



Figura 1: Micrografía de la presencia de caspasas activas 3 y 7 en espermatozoides de cerdo descongelados. A) Espermatozoides descongelados, (campo claro). B) Espermatozoides con presencia de caspasas 3 y 7 activas en la pieza media, (Fluorescencia verde). (C) Espermatozoides muertos (Fluorescencia roja). 400 X.

## Bibliografía

- Marchetti, P y Marchetti C. 2007. *Front. in Cell Apop. Res.* 125-138.
- Morales, ECL *et al.*, 2010. *J. Anim. Vet. Adv.* 11 (4): 431-437.
- Yeste, M *et al.*, 2015.
- Gutiérrez PO *et al.*, 2009. *Cryobiology.* 58: 287-292.