

Artículo de Revisión

EVALUACIÓN DEL ESTADO ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES DE LLAMA

Evaluation of acrosomal status on llama sperm

María Ignacia Carretero^{1,3,4}, Fernanda Gabriela Fumuso^{1,3,4}, Marcelo Miragaya^{1,3},
Susana María Giuliano^{2,3}

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.46>

¹ Cátedra de Teriogenología
² Cátedra de Física Biológica,
³ Instituto de Investigación y
Tecnología en Reproducción
Animal, Facultad de Ciencias
Veterinarias, Universidad de Buenos
Aires, Argentina.
⁴ Consejo Nacional de
Investigaciones Científicas y
Técnicas, Argentina.

E-mail: ignaciacarretero@fvet.uba.ar

INTRODUCCIÓN

La integridad de las membranas plasmática y acrosomal es de gran importancia para la funcionalidad de los espermatozoides. En la actualidad existen varias pruebas para evaluar la integridad y/o funcionalidad de la membrana plasmática, entre ellas las tinciones vitales con fluorocromos (como por ejemplo la tinción con Diacetato de 6-carboxifluoresceína e Ioduro de Propidio) y la prueba de endósmosis o HOS test, ambas utilizadas de rutina en laboratorios de investigación para evaluar semen de llama (Giuliano *et al.*, 2008; Carretero *et al.*, 2012; Casaretto *et al.*, 2012). En el semen de camélidos sudamericanos no se puede evaluar el acrosoma mediante microscopía de contraste de fase, ya que no se distingue como en otras especies. Por lo tanto diversas técnicas se han utilizado para poder evaluarlo utilizando tanto microscopía de campo claro como microscopía de fluorescencia.

INTRODUCTION

The plasma and acrosomal membrane integrity is very important for sperm function. There are currently several tests to evaluate plasma membrane integrity and/or functionality, including the vital staining with fluorochromes (such as for example: the stain with 6-carboxyfluorescein diacetate (6 CFDA) and propidium iodide (PI) and endosmosis test or hypo-osmotic swelling (HOS) test, weapons routinely used in research laboratories to

evaluate llama semen (Giuliano *et al.*, 2008; Carretero *et al.*, 2012; Casaretto *et al.*, 2012).

In South American camelids semen cannot evaluate the acrosome by phase contrast microscopy same manner in other species. Hence, need assessment techniques use bright field microscopy or fluorescence microscopy.

Evaluación del acrosoma del espermatozoide de llama mediante microscopía de campo claro

En espermatozoides de llama se ha evaluado la presencia y/o ausencia del capuchón acrosomal utilizando la tinción con Coomassie Blue (CB) (Giuliano *et al.*, 2012; Fumuso *et al.*, 2014; Carretero *et al.*, 2015). Esta técnica fue utilizada para evaluar el estado acrosomal en muestras de semen fresco, semen incubado con colagenasa, semen refrigerado y semen congelado/descongelado (figura 1). Los resultados indican que los frotis se pueden fijar, conservar a 4 °C por un período de 7 días y finalmente teñir en el momento de la evaluación. Otra alternativa, puede ser teñir los frotis el mismo día de la extracción, conservarlos a temperatura ambiente y observarlos al siguiente día. Los resultados obtenidos simplifican la técnica original de CB y permiten la evaluación simultánea de varias características seminales al poder evaluar el estado del acrosoma en un día diferente al día de la extracción de la muestra. Esta técnica es sencilla, económica y se evalúa mediante microscopía de campo claro; sin embargo, no permite evaluar la viabilidad

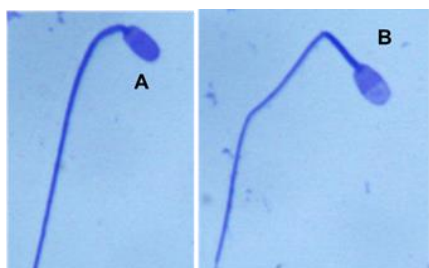


Figura 1. Espermatozoides de Llama teñidos con Coomassie Blue: A) Espermatozoide vivo con acrosoma presente y B) Espermatozoides con acrosoma ausente

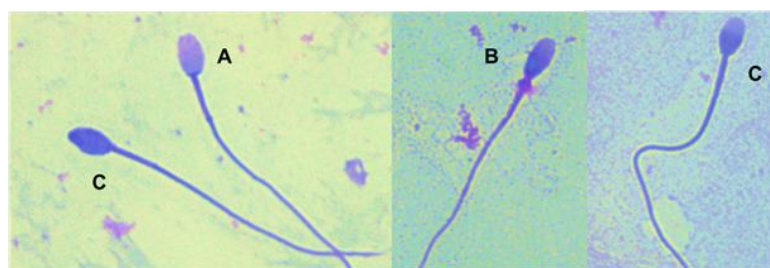


Figura 2. Espermatozoides de llama teñidos con triple tinción: A) Espermatozoide vivo con acrosoma presente (región post acrosomal celeste o azul claro y acrosoma púrpura), B) Espermatozoide muerto con acrosoma presente (región post acrosomal azul oscuro y acrosoma púrpura) y C) Espermatozoides muertos con acrosoma dañado o suelto (región post acrosomal azul oscuro y acrosoma violeta claro u oscuro).

Evaluación del acrosoma del espermatozoide de llama mediante microscopía de fluorescencia

Dentro de las técnicas que utilizan microscopio de fluorescencia para evaluar la reacción acrosomal (RA) se han utilizado una variedad de lectinas que se unen a glicoconjugados de la membrana acrosomal externa o de la matriz acrosomal (humano: Mortimer *et al.*, 1987; Ou, 1994; ratón: Tao *et al.*, 1993; cerdo: Vázquez *et al.*, 1993 y toro: Cross y Waston, 1994). Mortimer *et al.* (1987) observaron que el sitio específico de unión de la aglutinina del maní (Peanut agglutinin, PNA) en espermatozoides humanos era la membrana acrosomal

espermática. Una tinción de campo claro que permite determinar el estado acrosomal y la viabilidad espermática simultáneamente es la Triple Tinción (TT: Azul Tripán, Rojo Neutro y Giemsa).

En camélidos sudamericanos se han podido identificar cuatro patrones utilizando la TT (figura 2): 1- espermatozoides vivos con acrosoma presente (región post acrosomal celeste o azul claro y acrosoma púrpura); 2- espermatozoides vivos con acrosoma dañado o suelto (región post acrosomal celeste o azul claro y acrosoma lavanda claro u oscuro); 3- espermatozoides muertos con acrosoma presente (región post acrosomal azul oscuro y acrosoma púrpura); 4- espermatozoides muertos con acrosoma dañado o suelto (región post acrosomal azul oscuro y acrosoma violeta claro u oscuro) (Fumuso *et al.*, 2015). También, Fumuso *et al.* (2015) observaron una correlación positiva entre el porcentaje de espermatozoides con acrosoma presente evaluado a través de CB y el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto evaluados mediante TT, lo que estaría indicando que la mayoría de los espermatozoides con acrosoma presente evaluados mediante CB podrían estar vivos.

externa. Cheng *et al.* (1996) utilizaron Isotiocianato de Fluoresceína (Fluorescein isothiocyanate, FITC) conjugado con *Arachis hypogaea* agglutinin (FITC-peanut agglutinin; FITC-PNA) para evaluar la RA en espermatozoides equinos y comprobaron por microscopía electrónica que el FITC-PNA se unía a la membrana acrosomal externa. Los patrones descritos fueron: acrosoma intacto, acrosoma reaccionando y acrosoma reaccionado.

Se han realizado estudios que evaluaron, mediante microscopía de fluorescencia, el estado acrosomal de espermatozoides de alpaca utilizando FITC-PNA en

espermatozoides de epidídimo y de semen fresco (Morton *et al.*, 2010; Kershaw-Young y Maxwell, 2011). No obstante, en estos ensayos no se incluyeron fluorocromos que permitan diferenciar la población de espermatozoides reaccionados vivos de los muertos. Más tarde, Cheuquemán *et al.* (2013) evaluaron mediante citometría de flujo el estado acrosomal de espermatozoides de alpaca. Estos autores utilizaron FITC-PSA (FITC- Pisum sativum agglutinin) junto con un fluorocromo, el yoduro de propidio (IP), logrando identificar diferentes poblaciones celulares (espermatozoides viables con membrana acrosomal intacta, viables con membrana acrosomal dañada, muertos con membrana acrosomal intacta y espermatozoides muertos con membrana acrosomal dañada).

Recientemente, Carretero *et al.* (2015) utilizaron FITC-PNA junto al IP para poder identificar el estado acrosomal y la viabilidad en espermatozoides de llama mediante microscopía de fluorescencia. En este estudio, se determinaron seis patrones utilizando FITC-PNA/IP (figura 3): 1- espermatozoides vivos con acrosoma intacto (ausencia de fluorescencia en cabeza y en el capuchón acrosomal), 2- espermatozoides vivos con acrosoma reaccionando (ausencia de fluorescencia en cabeza y una fluorescencia verde intensa en el capuchón acrosomal), 3- espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado

(ausencia de fluorescencia en cabeza y una fluorescencia verde en forma de media luna o puntillado en el acrosoma o una fluorescencia verde a nivel del segmento ecuatorial), 4- espermatozoides muertos con acrosoma intacto (fluorescencia roja en la cabeza y ausencia de fluorescencia en el capuchón acrosomal), 5- espermatozoides muertos con acrosoma reaccionando (fluorescencia roja en la cabeza y una fluorescencia verde intensa en el capuchón acrosomal) y 6- espermatozoides muertos con acrosoma reaccionado (fluorescencia roja en la cabeza y una fluorescencia verde en forma de media luna o puntillado en el acrosoma o una fluorescencia verde a nivel del segmento ecuatorial). También Carretero *et al.* (2015) observaron una correlación positiva entre el porcentaje de acrosomas intactos evaluados con FITC-PNA/IP (espermatozoides vivos + muertos) y el porcentaje de acrosomas presentes evaluados por CB ($r = 0.64$; $P = 0.000$).

Muchos autores prefieren utilizar PNA debido a que presenta menor cantidad de sitios inespecíficos de unión al espermatozoide comparado con la PSA (Graham, 2001). Además, la PNA es la lectina de elección cuando se evalúan espermatozoides diluidos en medios que contienen yema de huevo debido a que la PSA presenta afinidad a sitios no específicos de la yema de huevo (Thomas *et al.*, 1997).

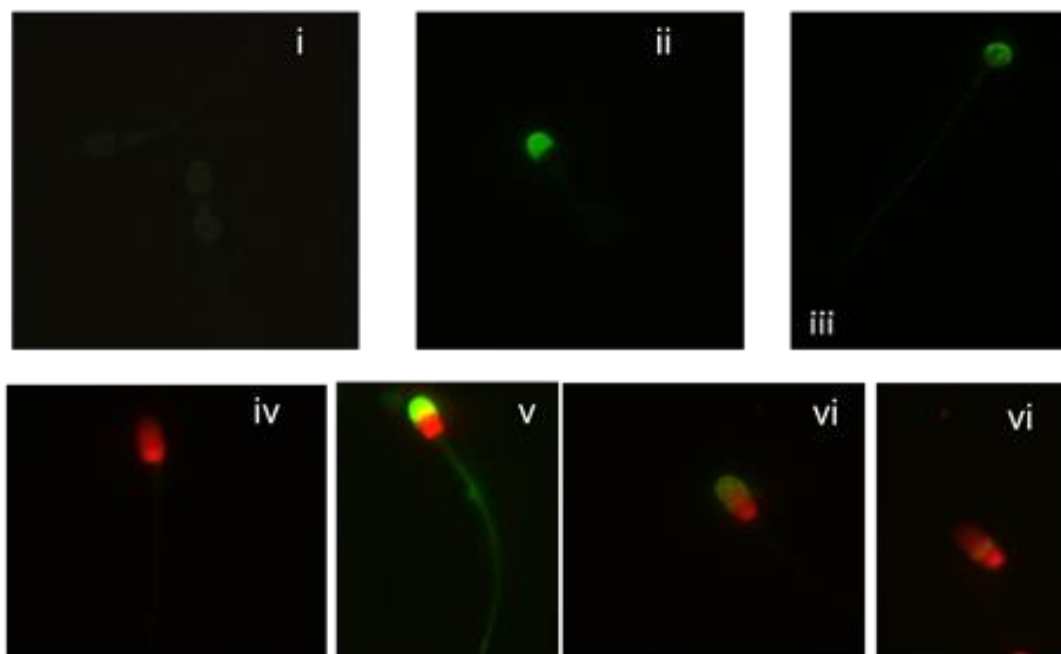


Figura 3. Patrones de espermatozoides de llama observados con la técnica de FITC-PNA/IP. i) Espermatozoides vivos con acrosomas intactos (sin fluorescencia en cabeza ni capuchón acrosomal), ii) Espermatozoide vivo con acrosoma reaccionando (sin fluorescencia en cabeza, fluorescencia verde intensa en capuchón acrosomal), iii) Espermatozoide vivo con acrosoma reaccionado (sin fluorescencia en cabeza, fluorescencia verde en capuchón acrosomal en forma de puntillado o media luna, o fluorescencia verde en segmento ecuatorial), iv) Espermatozoide muerto con acrosoma reaccionando (fluorescencia roja en la cabeza, y fluorescencia verde intensa en capuchón acrosomal) y vi)

Espermatozoide muerto con acrosoma reaccionado (fluorescencia roja en cabeza, fluorescencia verde en capuchón acrosomal en forma de puntillado o media luna, o fluorescencia verde en segmento ecuatorial).

Inducción de reacción acrosomal (RA)

Por otra parte, la evaluación de la habilidad del espermatozoide para llevar a cabo la RA es una herramienta útil para detectar defectos en la capacidad fecundante de los espermatozoides. La inducción artificial de la RA se ha realizado en varias especies mediante estímulos farmacológicos y fisiológicos, e incluso se ha inducido la remoción del contenido acrosomal mediante sonicación (Yu *et al.*, 2006). Dentro de los estímulos farmacológicos, uno de los más utilizados ha sido el ionóforo de calcio, tanto en el cobayo (Green, 1978) como en el bovino (Pereira *et al.*, 2000) caprino (Pereira *et al.*, 2000), equino (Cheng *et al.*, 1996) y en el hombre (Cardona-Maya *et al.*, 2006). También se ha utilizado como inductor de la RA, la incubación con diferentes compuestos lipídicos: fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina y lisofosfatidilinositol (Fleming y Yanagimachi, 1981; Graham *et al.*, 1986). Entre los estímulos fisiológicos de la RA, la incubación con líquido folicular ha sido el más utilizado en diferentes especies (Yanagimachi 1969; Iwamatsu y Chang, 1969).

Aparentemente la progesterona presente en el líquido folicular sería responsable de inducir la RA en la especie equina y humana (Cheng *et al.*, 1998; Schuffner *et al.*, 2002). En diferentes especies, utilizando el agregado de esta hormona en los medios de capacitación, lograron inducir la RA en forma similar a la fisiológica (equino: Cheng *et al.*, 1998; caprino: Somanath *et al.*, 2000; humano: Schuffner *et al.*, 2002 y porcino: Wu *et al.*, 2006). Según Birch *et al.*, (2009) la aptitud del acrosoma para reaccionar depende del estado fisiológico del espermatozoide. En condiciones *in vivo* sólo los espermatozoides capacitados pueden llevar a cabo la RA (Yanagimachi, 1994). Estudios de inducción de RA *in vitro* demostraron que este proceso depende de la presencia de calcio y de su concentración, más que de la presencia de agentes capacitantes (Birch *et al.*, 2009). En un trabajo realizado en nuestro laboratorio, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de blastocistos de llama obtenidos por fecundación *in vitro* (FIV) entre el semen incubado con seroalbúmina bovina (BSA) y el semen incubado con BSA más el agregado de otros agentes capacitantes (heparina, penicilamina, hipotaurina; Conde *et al.*, 2008).

Posteriormente se confirmó que los agentes capacitantes no serían esenciales para producir embriones mediante FIV (Trasorras *et al.*, 2012). Sin embargo, en estos trabajos los ovocitos fueron obtenidos mediante laparoscopia por el flanco posterior a la aplicación de una inyección de buserelina con el objetivo de producir una maduración *in vivo* de los ovocitos, brindando condiciones óptimas para la fecundación. En espermatozoides de

llama se han utilizado tanto inductores fisiológicos como farmacológicos para inducir la RA (Carretero *et al.*, 2015). Los resultados de este estudio mostraron que el ionóforo de calcio (A23187) fue el agente más potente para inducir la RA ($67.2 \pm 14.4\%$ de espermatozoides vivos + muertos con acrosomas reaccionados), sin embargo afectaron negativamente la movilidad y la viabilidad espermáticas. Mientras que la ionomicina y la progesterona presentaron menores efectos adversos en la movilidad y viabilidad pero indujeron menor RA.

CONCLUSIONES

El análisis de múltiples características seminales es esencial para evaluar el posible daño que pudieran causar sobre los espermatozoides los diferentes procesos *in vitro* a los que son sometidos (selección espermática, FIV, criopreservación de semen, etc.). La evaluación de la integridad acrosómica provee información adicional sobre las funciones espermáticas, complementarias a la evaluación seminal de rutina, contribuyendo a un análisis más completo de los eyaculados con el objetivo último de mejorar las técnicas de reproducción asistida utilizadas en la especie. Además, los avances y mejoras obtenidos en las biotecnologías reproductivas aplicadas a la llama podrían extrapolarse al resto de los CSA, principalmente a las especies silvestres como el guanaco y la vicuña.

REFERENCIAS

- Birch A, Labouriau R, Christensen P. Dynamics of the induced acrosome reaction in boar sperm evaluated by flow cytometry. *Anim Reprod. Sci.* 2009; 115: 124-136.
- Cardona-Maya WD, Olivera Angel M, Cadavid AP. Evaluación de la reacción acrosomal inducida por el ionóforo de calcio: una aproximación más real de la capacidad fecundante del espermatozoide. *Arch. Esp. Urol.* 2006; 59 (5): 501-510.
- Carretero MI, Lombardo D, Arraztoa CC, Giuliano SM, Gambarotta MC, Neild DM. Evaluation of DNA fragmentation in llama (*Lama glama*) sperm using the sperm chromatin dispersion test. *Anim. Reprod. Sci.* 2012; 31 (1-2): 63-71.
- Carretero MI, Fumuso FG, Neild D, Giuliano SM, Cetica P, Miragaya M. Evaluation of the acrosomal status in *Lama glama* sperm incubated with acrosome reaction inducers. *Anim. Reprod. Sci.* 2015; 160: 1-11.
- Casaretto C, Martínez Sarrasague M, Giuliano S, Rubin de Celis E, Gambarotta M, Carretero I, Miragaya M. Evaluation of *Lama glama* semen

- viscosity with a cone-plate rotational viscometer. *Andrología* 2012; 44: 335-341.
- Cheng FP, Fazeli A, Voorhout WF, Marks A, Bevers MM, Colenbrander AB Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *J. Androl.* 1996; 17(6): 674-682.
 - Cheng FP, Fazeli AR, Voorhout WF, Tremoleda JL, Bevers MM, Colenbrander B. Progesterone in mare follicular fluid induces the acrosome reaction in stallion spermatozoa and enhances *in vitro* binding to the zona pellucida. *Int. J. Androl.* 1998; 21: 57-66.
 - Cheuquemán C, Merino O, Giojalas L, Von Baer A, Sánchez R, Risopatrón J. Assessment of sperm function and DNA fragmentation in ejaculated alpaca sperm (*Lama pacos*) by flow cytometry. *Reprod. Dom. Anim.* 2013; 48(3): 447-453.
 - Conde P A, Herrera C, Trasorras VL, Giuliano SM, Director A, Miragaya MH, Chaves MG, Sarchi MI, Stivale D, Quintans C, Agüero A, Rutter B, Pasqualini S. *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2008; 109: 298-308.
 - Cross NL, Waston SK. Assessing acrosomal status of bovine sperm using fluoresceinated lectins. *Theriogenology* 1994; 42: 89-98.
 - Fleming AD, Yanagimachi R Effects of various lipids on the acrosome reaction and fertilizing capacity of guinea pig spermatozoa with special reference to the possible involvement of lysophospholipids in the acrosome reaction. *Gamete Res.* 1981; 4: 253-273.
 - Fumuso FG, Giménez ML, Neild DM, Giuliano SM, Chaves MG, Carretero MI. Comparación de métodos de lavado y tiempos de conservación de los frotis para evaluar el acrosoma en espermatozoides de llama mediante la tinción de Coomassie Blue. *Spermova* 2014; 4 (1):50-53.
 - Fumuso FG, Carretero MI, Neild DM, Miragaya MH, Giuliano SM. Evaluación de la viabilidad y el estado acrosomal en espermatozoides de llama (*Lama glama*). Resultados preliminares. Primer Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Reproducción Animal. 2015; ISSN 978-9874586209, pág., 399-402.
 - Giuliano S, Director A, Gambarotta M, Trasorras V, Miragaya M. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Anim. Reprod. Sci.* 2008; 104: 359-369.
 - Giuliano SM, Bisiau C, Carretero MI, Arraztoa CC, Neild D. Use of Comassie blue to evaluate acrosomal status in llama spermatozoa. Preliminary results. *Invet* 2012; 14(1): 279.
 - Graham JK, Foote RH, Parrish JJ. Effect of dilauroylphosphatidylcholine on the acrosome reaction and subsequent penetration of bull spermatozoa into zona-free hamster eggs. *Biol. Reprod.* 1986; 35: 413-424.
 - Graham J. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim. Reprod. Sci.* 2001; 68: 239-247.
 - Green DP. The induction of the acrosome reaction in guinea-pig sperm by the divalent metal cation ionophore A23187. *J. Cell Sci.* 1978; 32: 137-151.
 - Iwamatsu T, Chang MC. *In vitro* Fertilization of Mouse Eggs in the Presence of Bovine Follicular Fluid. *Nature* 1969; 224: 919-920.
 - Kershaw-Young CM, Maxwell WMC. The effect of seminal plasma on alpaca sperm function. *Theriogenology* 2011; 76: 1197-1206.
 - Mortimer D, Curtis EF, Miller RG. Specific labeling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1987; 81: 127-135.
 - Morton KM, Evans G, Maxwell WMC. Effect of glycerol concentration, Equex STM® supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology* 2010; 74: 311-316.
 - Ou MC. Acrosome reaction in the head-attached human sperm. *Andrología* 1994; 26: 17-20.
 - Pereira RJ, Tuli RK, Wallenhorst S, Holtz W. The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore A23187 on *in vitro* induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa. *Theriogenology* 2000; 54: 185-192.
 - Schuffner AA, Bastian SH, Duran HE, Lin ZY, Morshedi M, Frandek DR, Oehninger S. Zona pellucida-induced acrosome reaction in human sperm: dependency on activation of pertussis toxin-sensitive Gi protein and extracellular calcium, and priming the effect of progesterone and follicular fluid. *Mol. Hum. Reprod.* 2002; 8: 722-728.
 - Somanath PR, Suraj K, Gandhi KK. Caprine sperm acrosome reaction: promotion by progesterone and homologous zona pellucida. *S. Rum. Res.* 2000; 37: 279-286.
 - Tao J, Critser ES, Critser JK. Evaluation of mouse sperm acrosomal status and viability by flow cytometry. *Mol. Reprod. Dev.* 1993; 36: 183-194.
 - Thomas CA, Garner DL, DeJarnette JM, Marshall CE. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1997; 56: 991-998.
 - Trasorras V, Giuliano S, Chaves G, Neild D, Agüero A, Carretero MI, Pinto M, Baca Castex C, Alonso A, Rodríguez D, Morrell J, Miragaya M. *In vitro* Embryo Production in Llamas (*Lama glama*) from *In vivo* Matured Oocytes with Raw Semen Processed with Androcoll-E using Defined Embryo Culture Media. *Reprod Domest Anim.* 2012; 47(4): 562-567.

- Vázquez JM, Martínez E, Roca J, Pastor LM. Acrosome reaction of boar spermatozoa in homologous *in vitro* fertilization. Mol. Reprod. Dev. 1993; 36: 84-88.
- Wu JT, Chiang KC, Cheng FP. Expression of progesterone receptor(s) during capacitation and incidence of acrosome reaction induced by progesterone and zona proteins in boar spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 2006; 93:35-44.
- Yanagimachi R. *In vitro* acrosome reaction and capacitation of golden hamster spermatozoa by bovine follicular fluid and its fractions. J. Exp. Zool. 1969; 170: 269–280.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E. Neild JD (Eds). The Physiology of Reproduction. Raven Press Ltd. New York 1994; pp 189-317.
- Yu Y, Xu W, Yi YJ, Sutovsky P, Oko R. The extracellular protein coat of the inner acrosomal membrane is involved in zona pellucida binding and penetration during fertilization: characterization of its most prominent polypeptide (IAM38). Dev. Biol. 2006; 290: 32-43.