

## Frecuencia de espermatozoides con activación de caspasas 3/7 obtenidos de epidídimo de alpaca analizados mediante citometría de flujo

Frequency of spermatozoa with caspase 3/7 activation obtained from alpaca epididymis analyzed by flow cytometry

Luis Baez Oré<sup>1</sup>, Carlos Segura Zevallos<sup>1</sup>, José La Rosa Agapito<sup>1</sup>, Alexei Santiani<sup>1\*</sup>

### RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo determinar la proporción de células espermáticas de alpaca (*Vicugna pacos*) con caspasas-3/7 de forma activada. Se emplearon los epidídimos de 23 pares de testículos obtenidos del Camal Municipal de Huancavelica, Perú. En el laboratorio se empleó un dilutor (leche libre de grasa, yema de huevo y fructuosa) para la obtención de las células espermáticas de la parte caudal del epidídimo. Las células fueron sometidas a dos lavados con 1 mL de PBS y centrifugados. Al producto se le agregó 100 µL de *CellEvent™ Caspasa 3/7 Green Detection Reagent* y se incubó a 37.5 °C durante 30 min, mientras que 0.5 µL de Ioduro de Propidio fue agregado 10 minutos antes de finalizar la incubación, como marcador de muerte celular. La lectura se hizo mediante citometría de flujo. La media ± desviación estándar de células espermáticas con activación de caspasas 3/7 fue de 36.21 ± 11.25%, intervalo de confianza de 31.34 a 41.08% y un coeficiente de variación de 31.07%. Los datos presentaron una distribución normal de acuerdo con la prueba Kolmogorv-Smirnov. Las correlaciones entre espermatozoides con caspasas 3/7 activada con el peso y volumen del testículo y con la motilidad y concentración espermática no fueron significativas. Se estima entre 31 a 41% de espermatozoides epididimarios de alpaca se encuentran en proceso de apoptosis.

**Palabras clave:** espermatozoides, alpaca, citometría de flujo, apoptosis, caspasas

<sup>1</sup> Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

\* E-mail: [asantiania@unmsm.edu.pe](mailto:asantiania@unmsm.edu.pe)

Recibido: 10 de junio de 2022

Aceptado para publicación: 18 de noviembre de 2023

Publicado: 18 de diciembre de 2023

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

## ABSTRACT

The study aimed to determine the proportion of alpaca (*Vicugna pacos*) sperm cells with caspases-3/7 in an activated form. The epididymis of 23 pairs of testicles obtained from the Municipal Slaughterhouse of Huancavelica, Peru, were used. In the laboratory, an extender (fat-free milk, egg yolk and fructose) was used to obtain sperm cells from the caudal part of the epididymis. The cells were washed twice with 1 mL of PBS and centrifuged. It was added 100  $\mu$ L of CellEvent™ Caspase 3/7 Green Detection Reagent to the product and incubated at 37.5 °C for 30 min, while 0.5  $\mu$ L of Propidium Iodide was added 10 minutes before the end of the incubation, as a marker of cell death. The reading was done by flow cytometry. The mean  $\pm$  standard deviation of sperm cells with caspase 3/7 activation was  $36.21 \pm 11.25\%$ , confidence interval from 31.34 to 41.08% and a coefficient of variation of 31.07%. The data presented a normal distribution according to the Kolmogorov-Smirnov test. The correlations between spermatozoa with activated caspases 3/7 with the weight and volume of the testis and with sperm motility and concentration were not significant. It is estimated between 31 to 41% of alpaca epididymal spermatozoa are in the process of apoptosis.

**Key words:** spermatozoa, alpaca, flow cytometry, apoptosis, caspases

## INTRODUCCIÓN

La producción alpaquera es una de las actividades más importantes que se realizan a nivel de la región altoandina, principalmente por la producción de fibra de alta finura y carne con bajos porcentajes de grasa, en comparación con otras especies (Fernández-Baca, 1991; Gutiérrez *et al.*, 2018). Como consecuencia de ello, se han realizado diversos estudios incluyendo el uso de biotecnologías reproductivas para la evaluación del semen de alpaca. En este contexto, Villanueva *et al.* (2018) evaluaron la influencia del verano e invierno sobre la motilidad y concentración espermáticas, en tanto que Cheuqueman *et al.* (2013), empleando las sondas SYBR-14 y yoduro de propidio (PI), evaluaron tanto la viabilidad espermática como la integridad de la membrana plasmática. Por otro lado, Allauca *et al.* (2019) evaluaron el potencial de membrana mitocondrial (PMM) utilizando el fluorocromo MitoTracker Deep Red. Asimismo, Anzar *et al.* (2002) evaluaron la apoptosis y su vinculación con la motilidad y fertilidad empleando semen fresco y criopreservado de bovinos.

La palabra apoptosis, al igual que las características morfológicas que se logran apreciar durante el desarrollo celular, fueron inicialmente incorporadas y descritas por Kerr *et al.* (1972). Se define apoptosis, como una serie de fases que mantienen un orden determinado, donde ocurre un gasto de energía, y se ven involucradas un grupo de cisteínas aspartato proteasas, denominadas caspasas; cuyo principal objetivo es la eliminación completa de la célula (Elmore, 2007). En este sentido, Martí *et al.* (2008) evaluaron caspasas 3/7 activadas en células espermáticas de carnero, mediante las técnicas de inmunofluorescencia y *western blot*, mientras que Mendoza *et al.* (2009) reportaron células espermáticas de ovino con activación de caspasas 3/7 que aumentaron durante la refrigeración, siendo detectadas mediante citometría de flujo, técnica que permite evaluar un gran número de células y marcadores de manera exacta y breve (Omran *et al.*, 2013; Ahlering *et al.*, 2015).

Por otro lado, se ha observado que en los espermatozoides de porcino en contacto con óxido nítrico existe un incremento en la

activación de caspasas 3/7 (Moran *et al.*, 2008). En humanos, ovinos y porcinos, se han detectado, una relación entre espermatozoides con caspasas 3/7 de forma activada y la condición del semen (Marchetti P y Marchetti C, 2007; Pichardo *et al.*, 2010); además Weng *et al.* (2002), también en humanos, observaron una relación negativa entre espermatozoides marcados con caspasas 3/7 y motilidad espermática. Sin embargo, no han encontrado reportes similares sobre la activación de caspasas 3/7 u otro marcador de apoptosis en espermatozoides de alpaca. Por lo tanto, el objetivo del estudio fue establecer la proporción de espermatozoides de alpaca con caspasas 3/7 en su forma activada mediante citometría de flujo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar de Estudio

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

### Obtención de la Muestra

Los testículos de alpaca fueron conseguidos en el camal municipal de Huacavelica, Perú. Los órganos fueron limpiados y sumergidos en pares en bolsas herméticas con suero fisiológico al 0.9%, y transportados a 5 °C al laboratorio en un lapso de 18 a 20 horas. Se consideró que los testículos tengan un peso mayor a 10 g y una longitud superior o igual a 3 cm. Se calculó el volumen de los órganos (altura x ancho), siendo estos datos indicadores de madurez sexual en la alpaca (Abraham *et al.*, 2015).

### Recuperación de Espermatozoides

Se extrajo la túnica parietal y vaginal de cada testículo y se separó la cola del epidídimo. Estas fueron lavadas para retirar el fluido sanguinolento y se colocaron en placas

Petri. Se agregó 1 mL de la mezcla de dilución (0.970 g de fructuosa, 1 mL de yema de huevo y 19 mL de leche descremada). Se recuperaron los espermatozoides mediante presión y varios cortes en los epidídimos. Los espermatozoides fueron colectados en microtubos graduados de 1.5 mL.

### Concentración y Motilidad Espermática

Se empleó 10 µL de cada muestra seminal para su observación individual sobre una lámina portaobjeto y cubiertas por una lámina cubreobjeto, ambas temperadas (37.5 °C) en un microscopio óptico a 40x para determinar la motilidad.

Para determinar la concentración espermática se tomaron 10 µL de cada muestra, se colocaron en microtubos de 1.5 mL. Se agregó 190 µL de agua (dilución de 1:20), dando como resultado final, un volumen a 200 µL. En una cámara de Neubauer se colocaron 10 µL de cada dilución y se observaron en el microscopio óptico a 40x contabilizando los espermatozoides de los cuadrantes extremos y medio de ambas cámaras para luego hacer un promedio.

### Preparación de la Muestra

Se agregó 1 mL de PBS a cada 100 µL de las muestras en cada microtubo individual, en dos oportunidades, para realizar dos lavados por centrifugación (600 G durante 8 min). Luego se eliminó el sobrenadante y se agregó 100 µL a cada microtubo de la solución diluida *CellEvent™ Caspasa-3/7 Green Detection Reagent* (C10723, Invitrogen), se homogenizó y se incubó a 37.5 °C durante 30 min. A los 20 min de iniciada la incubación se adicionó 0.5 µL de yoduro de propidio (2.4 mM); dando como resultado final una concentración de 12 µM.

### Evaluación por Citometría de Flujo

Al término del proceso de incubación se empleó el citómetro de flujo FlowSight (Amnis, USA), para evaluar las muestras

dentro de los microtubos. Para excitar las Caspasas 3/7 y el yoduro de propidio se empleó un láser a 488 nm y la emisión de fluorescencia fue detectada utilizando una longitud de onda 505 a 560 nm (Canal 2, Ch02) para Caspasas 3/7 y de 642 a 740 nm (Canal 5, Ch05) para yoduro de propidio.

### Análisis Estadístico

Se empleó el programa Graphpad Prim v. 3.0 para el análisis de los datos, obteniendo los principales parámetros de estadística descriptiva. Se hizo uso de la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Test K-S), para establecer el tipo de distribución. Por último, los resultados fueron correlacionados con el peso y volumen testicular; así como con la concentración y motilidad seminal.

## RESULTADOS

El volumen y peso de los testículos fue de  $22.5 \pm 6.1 \text{ cm}^3$  y  $17.1 \pm 3.3 \text{ g}$ , respectivamente, en tanto que la concentración y motilidad espermática fue de  $123.8 \pm 101.7 \times 10^6$  y  $35.6 \pm 22.3\%$ , respectivamente (media  $\pm$  desviación estándar). Asimismo, el  $36.21 \pm 11.25\%$  (media  $\pm$  desviación estándar) de los espermatozoides presentaron activación de caspasas, con un rango del intervalo de confianza de 31.34 a 41.08% y un coeficiente de variación de 31.07%. Los datos siguieron una distribución normal.

En el Cuadro 1 se observa la correlación entre los porcentajes de espermatozoides caspasas 3/7 activadas con las características testiculares y seminales. Solo se encontró una correlación significativa y fuerte al enfrentar los espermatozoides con caspasas 3/7 de forma activada y la suma de las células espermáticas apoptóticas con células muertas.

Cuadro 1. Correlación del porcentaje de células espermáticas caspasas 3/7 activadas con parámetros testiculares y seminales

| Espermatozoides caspasa 3/7 positivos | r    | Valor p |
|---------------------------------------|------|---------|
| Espermatozoides muertos + apoptóticos | 0.94 | <0.0001 |
| Peso del testículo                    | 0.20 | 0.36    |
| Volumen del testículo                 | 0.09 | 0.67    |
| Concentración espermática             | 0.26 | 0.23    |
| Motilidad                             | 0.30 | 0.15    |

En la Figura 1 se aprecia dos Dot Plots (módulos de gráficos) elaborados a partir del análisis de las muestras analizadas. En el modelo A se aprecia inicialmente una viabilidad cercana al 70% y cerca del 30% de espermatozoides en apoptosis; sin embargo, en el modelo B se observa un elevado número de espermatozoides muertos (73%) y una baja cantidad de espermatozoides en apoptosis (2%).

## DISCUSIÓN

Este es el primer estudio sobre apoptosis en espermatozoides de alpaca, encontrando un  $36.21 \pm 11.25\%$  de células apoptóticas. Los valores del intervalo de confianza y del coeficiente de variación indican el nivel de dispersión de los resultados obtenidos.

El proceso de activación de las caspasas 3/7 es un suceso representativo del desarrollo de la apoptosis. La presencia de estas enzimas de forma activa desencadena la cascada de señales celulares que responden a ciertos eventos que favorecen la apoptosis, dando como resultado, una alteración en el mantenimiento del equilibrio necesarios para la sobrevivencia de la célula (Elmore, 2007).

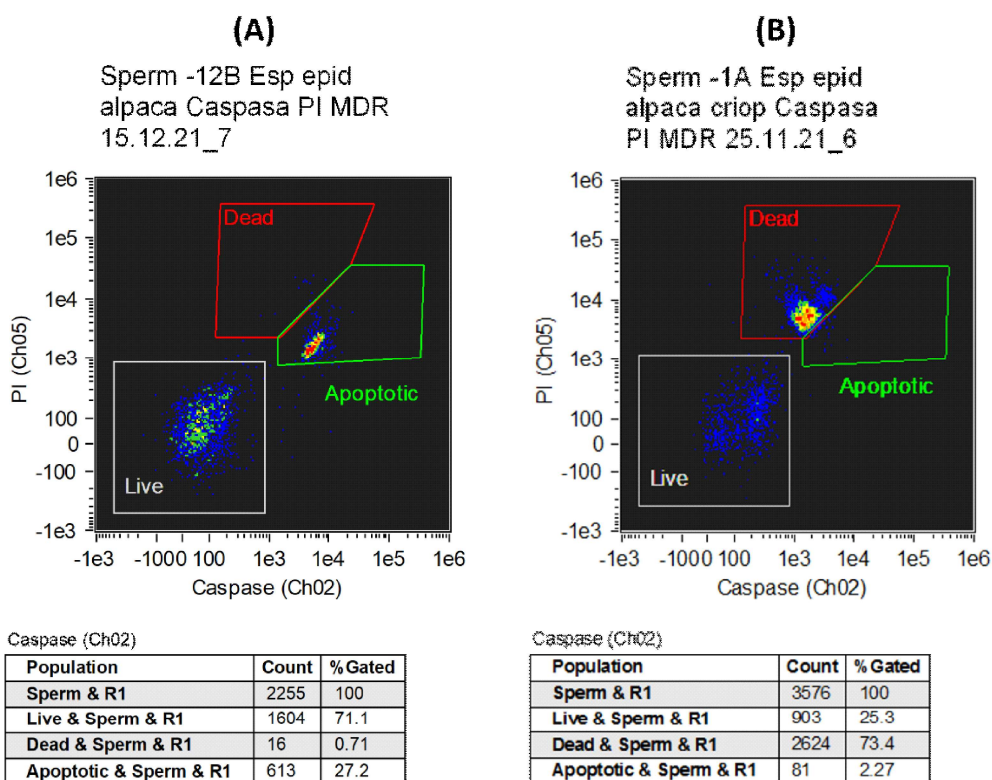


Figura 1. Gráficos de controles luego del análisis de las muestras de espermatozoides epididimarios de alpaca haciendo uso de las sondas fluorescentes Caspasa 3/7 green (Ch02) y Ioduro de Propidio (PI) (Ch05) analizados mediante citometría de flujo. (A) Muestra espermática con elevada proporción de células vivas y moderada proporción de células apoptóticas. (B) Muestra espermática con baja proporción de células vivas y elevada proporción de células apoptóticas

Los resultados indican que los espermatozoides de epidídimo (Caspasas 3/7 positivos), antes de acabar su desarrollo, sufren de alteraciones, ya sea en su ADN o cromosomas, de tal manera que serían depurados o desechados mediante el proceso de la apoptosis. Los resultados obtenidos, por lo tanto, indican que más de un tercio de las células espermáticas de la alpaca, provenientes del epidídimo, están en proceso de apoptosis, estando su capacidad fecundante reducida o limitada.

Si bien no se han encontrado reportes semejantes en espermatozoides de alpaca, Kotwicka *et al.* (2008) reportan 19.7% de células espermáticas positivas a caspasas 3/7 en humanos, en tanto que Mendoza *et al.* (2009) encontraron 2.82% de estas células en ovinos, valores inferiores a los del presente estudio. No obstante, en equinos se reportó 31.7% de espermatozoides positivos a caspasas 3/7 (Martin *et al.*, 2017), especie filogenéticamente más cercana a las alpacas, en comparación a humanos o rumiantes.

Es importante mencionar que esta diferencia de resultados podría justificarse por la alta presencia de células espermáticas anormales observadas usualmente en el semen de alpaca (Bravo *et al.*, 1997), como también por el tiempo y condiciones de transporte de los testículos al laboratorio, e incluso por la forma de recolección de los espermatozoides. Se reconoce que las células espermáticas no normales en el epidídimo son eliminadas y reabsorbidas, pues esto es una de las funciones del epidídimo (Oehninger *et al.*, 2003). En consecuencia, se puede asumir que en el eyaculado se debería encontrar un porcentaje inferior de apoptosis en relación con lo encontrado en espermatozoides epididimarios. En ese sentido, en espermatozoides epididimarios de ratón, Zacchini *et al.* (2021) observaron porcentajes de espermatozoides apoptóticos entre 25 a 45%.

No se encontraron correlaciones significativas entre espermatozoides con caspasas 3/7 y los parámetros testiculares y seminales básicos, tal y como tampoco fue encontrado en porcinos (Morales *et al.*, 2012) y en humanos (Perticarari *et al.*, 2007; Kotwicka *et al.*, 2008). No obstante, en el presente estudio se detectó una correlación significativa entre las células espermáticas caspasa 3/7 positivas y la sumatoria de las células espermáticas apoptóticas y muertas. Esto permite inferir que las poblaciones identificadas como apoptóticas y muertas son bastante similares en cuanto a características de fluorescencia, tal y como se reporta en equinos (Martin *et al.*, 2017). Por otro lado, se reporta una relación entre actividad de caspasas 3/7 con fragmentación del ADN y translocación de la fosfatidilserina en espermatozoides humanos (Weng *et al.*, 2002), disfunción mitocondrial y la fragmentación nuclear (Marchetti *et al.* 2004).

Los resultados indicarían que antes de utilizar muestras aparentemente aceptables de espermatozoides epididimarios para inseminación artificial, criopreservación o fecundación *in vitro* sería aconsejable evaluar los

parámetros de apoptosis en espermatozoides de alpaca como indicador del posible éxito de la técnica a emplearse.

## CONCLUSIÓN

El porcentaje de espermatozoides de epidídimo de alpaca con caspasas 3/7 de forma activada se encuentran entre 31 a 41%, sin relación con los parámetros peso y volumen testicular; ni con la motilidad espermática o concentración seminal.

## Agradecimientos

El estudio fue financiado por el Contrato 135 – 2020 – FONDECYT «Indicadores de fertilidad en espermatozoides criopreservados de alpaca: estudio de la apoptosis espermática, despolarización de membrana, integridad de ADN y estabilidad de cromatina» y por el Proyecto PCONFIG2020 «Caracterización molecular y funcional de la apoptosis durante el proceso de criopreservación de espermatozoides de alpaca» A20080381.

## LITERATURA CITADA

1. **Abraham MC, Puhakka J, Ruete A, Al-Essawe EM, de Verdier K, Morrel JM, Bage R. 2015.** Testicular length as an indicator of the onset of sperm production in alpacas under Swedish conditions. *Acta Vet Scand* 58: 10.
2. **Ahlering P, Sutovsky P. 2015.** Biomarker-based flow cytometric semen analysis for male infertility diagnostics and clinical decision making in ART. In: *Screening the single euploid embryo: molecular genetics reproductive medicine.* Springer Cham. p 33-51.
3. **Allauca P, Ugarelli A, Santiani A. 2019.** Determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo durante el proceso de

- criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpacas. *Rev Inv Vet Perú* 30: 288-298. doi: 10.15381/rivep.v30i1.15677
4. **Anzar M, He L, Buhr MM, Kroetsch TG, Pauls KP. 2002.** Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol Reprod* 66: 354-360. doi: 10.1095/biolreprod66.2.354
  5. **Bravo PW, Flores D, Ordonez C. 1997.** Effect of repeated collection on semen characteristics of alpacas. *Biol Reprod* 57: 520-524. doi: 10.1095/biolreprod57.3.520
  6. **Cheuqueman C, Merino O, Giojalas L, Von Baer A, Sánchez R, Risopatrón J. 2013.** Assessment of sperm function parameter and DNA fragmentation ejaculated alpaca sperm (*Lama pacos*) by flow cytometry. *Reprod Domest Anim* 48: 447-453. doi: 10.1111/rda.12096
  7. **Elmore S. 2007.** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35: 495-516. doi: 10.1080/0192623070-1320337
  8. **Fernández-Baca S. 1991.** Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Santiago de Chile: Oficina Regional de la FAO para América y el Caribe. 429 p.
  9. **Gutiérrez G, Gutiérrez JP, Huanca T, Wurzinger M. 2018.** Challenges and opportunities of genetic improvement in alpacas and llamas in Peru. In: *World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*. Auckland, New Zealand.
  10. **Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Brit J Cancer* 26: 239-257. doi: 10.1038/bjc.1972.33
  11. **Kotwicka M, Filipiak A, Jedrzejczak P, Warchol J. 2008.** Caspase-3 activation and phosphatidylserine membrane translocation in human spermatozoa: there is a relationship? *Reprod Biomed Online* 16: 657-663. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60479-8
  12. **Marchetti C, Gallego M, Defossez A, Formstecher P, Marchetti P. 2004.** Staining of human sperm with fluorochrome-labeled inhibitor of caspases to detect activated caspases: correlation with apoptosis and sperm parameters. *Hum Reprod* 19: 1127-1134. doi: 10.1093/humrep/deh222
  13. **Marchetti P, Marchetti C. 2007.** Impact and significance of apoptosis in human ejaculated spermatozoa. In: Erlich SR (ed). *Frontiers in cell apoptosis research*. 2<sup>da</sup> ed. New York: Nova Biomedical Books. p 125-138.
  14. **Martí E, Pérez-Pé R, Colás C, Muñío-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 2008.** Study of apoptosis-related markers in ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 106: 113-132 doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.-04.009
  15. **Martin P, Anel-López L, Ortiz-Rodriguez J, Alvarez M, De Paz P, Balao C, Rodriguez H, et al. 2017.** Redox cycling induces spermtosis and necrosis in stallion spermatozoa while the hydroxyl radical (OHU) only induces spermtosis. *Reprod Domest Anim* 53: 54-67. doi: 10.1111/rda.13052
  16. **Mendoza N, Pérez R, Cebrián J, Muñío M. 2009.** Puesta a punto de un método de determinación de espermatozoides con caspasas activas en semen de ovino. En: *XIII Jornadas sobre Producción Animal*. Zaragoza, España.
  17. **Morales C, Aragón A, Pescador N, Salazar F. 2012.** Swim-up procedure in boar semen improves motility and viability but recovered sperm could carry active caspases and chromatin damage. *J Anim Vet Adv* 11: 431-437. doi: 10.3923/javaa.2012.431.437
  18. **Moran JM, Madejón L, Ortega C, Peña FJ. 2008.** Nitric oxide induces caspase activity in boar spermatozoa. *Theriogenology* 70: 91-96. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.02.010
  19. **Oehninger S, Morshedi M, Weng S-L, Taylor S, Duran H, Beebe S. 2003.** Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated

- spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 7: 469-476. doi: 10.1016/s1472-6483-(10)61892-5
20. **Omran H, Bakhiet M, Dashti M. 2013.** DNA integrity is a critical molecular indicator for the assessment of male infertility. *Mol Med Rep* 7: 1631-1635. doi: 10.3892/mmr.2013.1390
21. **Ortega C, Anel-Lopez L, Ortiz M, Martín P, Alvarez M, De Paz P, Peña J, et al. 2017.** Stallion spermatozoa surviving freezing and thawing experience membrana depolarization and increased intracellular Na<sup>+</sup>. *Andrology* 5: 1174-1182. doi: 10.1111/andr.12419
22. **Perticarari S, Ricci G, Granzotto M, Boscolo R, Pozzobon C, Guarnieri S, Sartore A, et al. 2007.** A new multiparameter flow cytometric method for human semen analysis. *Hum Reprod* 22: 485-494. doi: 10.1093/humrep/del415
23. **Pichardo A, Aragón A, Ayala M, Domínguez I. 2010.** Viability tests, active caspase-3 and-7, and chromatin structure in ram sperm selected using the swim-up procedure. *J Androl* 31: 169-176. doi: 10.2164/jandrol.108.007021
24. **Villanueva JC, Huanca WF, Hilari F, Uchuari M, Rodríguez F, Huanca W. 2018.** Efecto de la estación sobre las características seminales de alpacas (*Vicugna pacos*) criadas a nivel del mar. *Rev Inv Vet Perú* 29: 559-564. doi: 10.15381/rivep.v29i2.14483
25. **Weng S-L, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S, Oehninger S. 2002.** Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod* 8: 984-991. doi: 10.1093/molehr/8.11.984
26. **Zacchini F, Bochenek M, Bisogno S, Chan A, Ptak G. 2021.** The age and mouse sperm quality: a flow cytometry investigation. *BioRxiv - Developmental Biology*. 18 p. doi: 10.1101/2021.07.-18.451583