

Evaluación mediante citometría de flujo de la integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca en muestras frescas sin fijar (0 horas) y muestras fijadas en formaldehído (24 horas y 1 semana)

Flow cytometry evaluation of acrosome integrity of alpaca spermatozoa in fresh unfixed samples (0 hours) and samples fixed in formaldehyde (24 hours and 1 week)

Josselyn Delgado Ordinola¹, Luis Ruiz García¹, Alexei Santiani^{1*}

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar la integridad del acrosoma (IA) en espermatozoides epididimarios de alpaca, tanto frescos sin fijar como fijados con formaldehído al 2%, utilizando la técnica de citometría de flujo con FITC-PSA como fluorocromo. Se obtuvieron los espermatozoides epididimarios de 26 testículos y se agruparon en muestras de 0 horas, 24 horas y 1 semana. Las muestras se incubaron con FITC-PSA (concentración 2.5 µg/mL). Las muestras de 24 horas y 1 semana se conservaron en refrigeración durante el tiempo correspondiente. Para la evaluación se retiró el formaldehído mediante lavados con PBS. Los espermatozoides sin fluorescencia verde fueron considerados con acrosoma intacto. Los resultados mostraron que los porcentajes de IA fueron de $95.89 \pm 4.35\%$ (0 horas), $97.24 \pm 3.36\%$ (24 horas) y $97.21 \pm 3.49\%$ (1 semana). La correlación de Pearson entre las muestras sin fijar con muestras fijadas por 24 horas y 1 semana mostró correlaciones fuertes y positivas ($r=0.86$ y $r=0.84$, respectivamente). El análisis de gráficos mostró que la mayor parte de los resultados coincidían con

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

* Autor para correspondencia: Alexei Santiani; asantiania@unmsm.edu.pe

Recibido: 14 de febrero de 2023

Aceptado para publicación: 16 de mayo de 2024

Publicado: 28 de junio de 2024

©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

los límites establecidos. En conclusión, la IA en espermatozoides frescos sin fijar (0 horas) es comparable a la de las muestras conservadas por 24 horas y 1 semana utilizando formaldehído.

Palabras clave: citómetro de flujo, FITC-PSA, integridad acrosomal, espermatozoide, alpaca, formaldehído

ABSTRACT

The aim of the study was to determine the acrosome integrity (AI) in alpaca epididymal spermatozoa, both fresh unfixed and fixed with 2% formaldehyde, using the flow cytometry technique with FITC-PSA as fluorochrome. Epididymal sperm were obtained from 26 testes and grouped into 0-hour, 24-hour and 1-week samples. The samples were incubated with FITC-PSA (concentration 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The 24-hour and 1-week samples were kept refrigerated for the corresponding time. For evaluation, formaldehyde was removed by washing with PBS. Sperm without green fluorescence were considered to have an intact acrosome. The results showed that the AI percentages were $95.89 \pm 4.35\%$ (0 hours), $97.24 \pm 3.36\%$ (24 hours) and $97.21 \pm 3.49\%$ (1 week). Pearson correlation between unfixed samples with samples fixed for 24 hours and 1 week showed strong and positive correlations ($r=0.86$ and $r=0.84$, respectively). Graph analysis showed that most of the results were in line with the established limits. In conclusion, AI in fresh unfixed sperm (0 hours) is comparable to that of samples preserved for 24 hours and 1 week using formaldehyde.

Key words: alpaca, sperm, FITC-PSA acrosomal integrity, flow cytometer, formaldehyde

INTRODUCCIÓN

La estructura del acrosoma es un tipo de vesícula secretora con una doble membrana que cubre la parte frontal del núcleo del espermatozoide. Durante la fecundación, las membranas externa y plasmática se fusionan en un proceso denominado reacción acrosomal (RA), liberándose casi por completo el contenido acrosómico (Yanagimachi, 1994). El acrosoma contiene enzimas como la hialuronidasa y la acrosina, que permiten que el espermatozoide atraviese la zona pelúcida del ovocito a través de un pequeño espacio formado por la acción enzimática (Glassner *et al.*, 1991). La liberación de las enzimas acrosomales se produce cuando se unen el espermatozoide y la zona pelúcida, lo cual desencadena mecanismos de señalización y aumento del calcio intracelular (Yanagimachi, 1994; Harrison, 1998).

Hay varias técnicas propuestas para evaluar la integridad acrosomal (IA), incluyendo microscopía de campo claro, citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. También se ha utilizado la técnica de doble tinción en conjunto con la microscopía de campo claro para determinar la viabilidad y la IA en camélidos sudamericanos (Santiani *et al.*, 2005; Banda *et al.*, 2010). En la microscopía de fluorescencia se han utilizado lectinas unidas a fluoresceína para unirse a glicoproteínas específicas del acrosoma, siendo *Pisum sativum* (PSA) y *Arachis hypogaea* (Peanut, PNA) los conjugados más comúnmente usados en humanos (Risopatrón *et al.*, 2001), ovinos (Celeghini *et al.*, 2010), porcinos (Siciliano *et al.*, 2008), conejos (Hernández *et al.*, 2012) y camélidos (Santiani *et al.*, 2016; Ugarelli *et al.*, 2017). En los casos de daño acrosomal, las lectinas pueden unirse a las glicoproteínas del acrosoma y emitir fluorescencia verde.

Se ha demostrado que la precisión de la microscopía es dependiente del operador y requiere mucho tiempo para evaluar las muestras, ya que se necesita contar una gran cantidad de células para obtener un resultado estadístico adecuado (Gillan *et al.*, 2005). En la actualidad se prefiere el uso de fluoro-cromos en la citometría de flujo debido a la capacidad de analizar automáticamente y de manera precisa células suspendidas en flujo, detectando las intensidades de fluorescencia, lo que permite evaluar un mayor número de eventos, que pueden variar entre 8000 y 20 000 células (Gillan *et al.*, 2005). El fluorocromo *Fluorescein isothiocyanate* (FITC) conjugado con PSA se utiliza para evaluar la IA en alpacas y ha sido objeto de estudios (Morton *et al.*, 2010; Cheuqueman *et al.*, 2013; Santiani *et al.*, 2016; Ugarelli *et al.*, 2017), aunque solo se ha evaluado con muestras frescas.

Peña *et al.* (2017) han sugerido la fijación de muestras frescas de espermatozoides de animales con formaldehído como una técnica para su posterior análisis en el laboratorio. Así, se ha evaluado la viabilidad y el potencial de la membrana mitocondrial de semen de caballos fijadas con formaldehído, encontrando resultados similares a las muestras frescas. Con base a estos resultados, sería posible evaluar otros parámetros espermáticos en muestras fijadas con formaldehído y evaluados días después; por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue comparar la IA de las células espermáticas de alpaca en muestras frescas y fijadas con formaldehído usando FITC-PSA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se recolectaron 26 testículos de 16 alpacas sacrificadas en el Camal Municipal de Ninacaca, en Pasco, Perú. Las muestras fueron lavadas con solución salina al 0.9%,

guardadas en forma individual en bolsas plásticas con solución fisiológica, y almacenadas a 5 °C en cajas de transporte para su traslado al laboratorio de la Facultad de Medicina Veterinaria (FMV) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos ((UNMSM) en Lima. Las muestras llegaron al laboratorio en un lapso de 20 horas.

Procedimiento Metodológico

Las colas epididimarias fueron separadas de los testículos y fueron lavadas con PBS a 37 °C. Después, cada parte caudal del epidídimo fue colocada en placas Petri y se agregó 1 ml de PBS temperado. Se recuperaron los espermatozoides empleando varios cortes en el tejido. Luego, las suspensiones se recogieron en tubos Eppendorf y se mantuvieron a 37 °C.

Se dividió cada muestra en tres porciones de 100 iL para los tres grupos experimentales: Muestras evaluadas a las 0 horas (control, sin fijar), Muestras evaluadas después de 24 horas y Muestras evaluadas después de una semana; estos dos últimos grupos fijados en formaldehído. Se agregó FITC-PSA a cada alícuota, para llegar a una concentración final de 2.5 ig/mL). Luego, las muestras se incubaron a 38 °C por 10 min en oscuridad.

Fijación con Formaldehído

En los tratamientos correspondientes, se aplicó una fijación 1:1 con formaldehído (100 iL al 4% (para obtener una concentración final de 2%) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego, se guardaron en la oscuridad en refrigeración (+4 °C) por 24 horas o 1 semana. Previo a la evaluación, se eliminó el formaldehído mediante un lavado por centrifugación (600 g durante 8 min) con PBS. Después de la centrifugación, se descartó el exceso y se añadió PBS (100 iL a 38 °C) para ser evaluado por el citómetro de flujo.

Preparación de Controles

Para comprobar la reacción positiva de FITC-PSA se empleó un control con calcio ionóforo A23187. Brevemente, 1 μ L de calcio (1 mM) fue añadido a 100 μ L de semen (concentración final: 10 μ M). Se incubaron a 38 °C durante 60 min y se hizo la lectura final en el citómetro de flujo (Santiani *et al.*, 2016). En el control negativo de FITC-PSA se evaluó una muestra de semen sin FITC-PSA.

Análisis por Citometría de Flujo

Se hizo un análisis de fluorescencia con un equipo FlowSight (Amnis, EE. UU.), que tiene un sistema analizador de imágenes. Se seleccionaron 10 000 eventos que se consideraron compatibles con células espermáticas considerando su proporción de ancho/largo y tamaño. Se usó un láser 488 nm a 15 mW para excitar el FITC-PSA, y se capturó la emisión de fluorescencia entre 505 a 560 nm (Ch02). Adicionalmente, se usó un campo claro (Ch01) para verificar la presencia de espermatozoides. Los espermatozoides con acrosomas intactos se identificaron como aquellos que no mostraban fluorescencia verde en la región acrosomal, mientras que los espermatozoides con daño en el acrosoma se consideraron aquellos que exhibían fluorescencia verde en esta área.

Análisis Estadístico

Los valores obtenidos son presentados como medias aritméticas con su desviación estándar. Además, se hizo una prueba de correlación de Pearson (r) para comparar los porcentajes de IA del tratamiento 0 h frente al de 24 h y de 0 h frente a 1 semana (sem). Para visualizar las diferencias entre las mediciones relacionadas se utilizó una gráfica de Bland-Altman (Dispersión de puntos) a fin de determinar el sesgo promedio al comparar un estudio con otro, lo que permitió una mejor comprensión de los resultados obtenidos.

RESULTADOS

Las medias de integridad acrosomal en espermatozoides de alpaca, según tratamiento, se muestran en el Cuadro 1.

Las imágenes de los espermatozoides fueron capturadas en dos canales de detección (Ch01 y Ch02), permitiendo visualizar el acrosoma reaccionado a través de la fluorescencia verde causada por la FITC-PSA. La Figura 1 muestra un ejemplo de un espermatozoide con acrosoma intacto y otro con acrosoma reaccionado.

Los resultados del análisis se presentan en forma de histogramas (Figura 2). El control de autofluorescencia de FITC-PSA mostró una población única en el eje X, indicando porcentajes altos de espermatozoides con acrosomas intactos. El control positivo con el inductor de RA mostró una población única en el eje X que muestra porcentajes altos de espermatozoides con acrosomas reaccionados. Los histogramas de las muestras 0 h, 24 h y 1 semana mostraron una población mayor a la izquierda del eje X que corresponde a células espermáticas con acrosomas intactos, y una población menor a la derecha del eje X que representa las células espermáticas con RA. Estos resultados permiten evaluar de manera objetiva los efectos del tratamiento con formaldehído en la IA de los espermatozoides de alpaca.

Cuadro 1. Integridad acrosomal (%) obtenida en espermatozoides de alpaca con o sin fijación en formaldehído

Tratamiento	Integridad acrosomal ¹
0 h	95.89 \pm 4.35
24 h	97.24 \pm 3.36
1 sem	97.21 \pm 3.49

¹ Valores son medias \pm desviación estándar

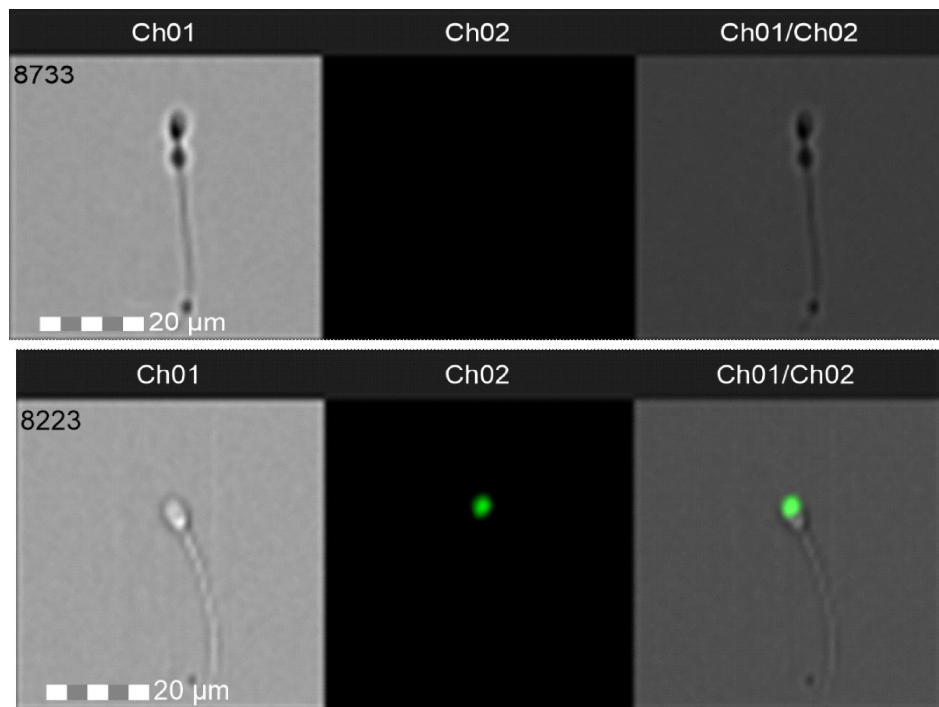


Figura 1. Muestras fotográficas de espermatozoides capturadas por el sistema analizador de imágenes del citómetro de flujo. Las imágenes de la izquierda (Ch01) muestran el espermatozoide en un campo claro y las imágenes de la derecha (Ch02, 505-560 nm) muestran la fluorescencia a FITC-PSA. La imagen superior muestra un espermatozoide con acrosoma intacto sin fluorescencia, mientras que imagen inferior muestra la región acrosomal con fluorescencia verde, indicando que el espermatozoide tiene reacción acrosomal

El cuadro 2 muestra las correlaciones entre los porcentajes de IA a las 0 horas y las de 24 horas y una semana, que fueron fuertes, positivas y significativas ($p < 0.0001$).

En la Figura 3 se ilustran los resultados comparativos de la integridad del acrosoma entre las muestras no fijadas en 0 h y las fijadas en 24 h y 1 semana a través de gráficos de dispersión. La Figura 4 presenta los análisis de Bland y Altman, que evalúan la correspondencia entre la integridad acrosomal a las 0 h y luego de 24 h, así como entre 0 h y luego de 1 semana, mediante la comparación de la media de las diferencias para evaluar si un resultado puede ser reemplazado por el otro. Los valores se encuentran dentro de los límites de concordancia, con una excepción.

DISCUSIÓN

Este estudio es novedoso al reportar la capacidad de evaluar la integridad acrosomal (IA) en espermatozoides de alpaca en tres periodos (0 y 24 horas y una semana de colección), siempre y cuando se haya fijado previamente la muestra, logrando resultados similares a la evaluación en muestras frescas recién obtenidas (0 horas). Las muestras de espermatozoides fueron fijadas con formaldehído, y la IA fue identificada mediante el uso de FITC-PSA. La utilización de espermatozoides epididimarios de alpaca como modelo para su estudio ha sido previamente discutido por diferentes autores (Morton *et al.*, 2007, 2010; Santiani *et al.*, 2016; Ugarelli

Cuadro 2. Correlación de Pearson entre la integridad acrosomal (%) de espermatozoides de alpaca en 16 muestras sin fijar (0 h) versus muestras fijadas con formaldehído 2% (24 h y 1 sem)

Integridad acrosomal	Correlación de Pearson	
	r	p
0 h vs. 24 h	0.8589	p<0.0001
0 h vs. 1 sem	0.8419	p<0.0001

et al., 2017). Previamente, FITC-PSA ha sido utilizado para evaluar la IA de los espermatozoides de alpaca, pero solo en muestras frescas (Cheuqueman *et al.*, 2013).

En cuanto a la integridad del acrosoma en espermatozoides de alpaca, los resultados indicaron que entre el 95 y 97% de ellos presentaron un acrosoma intacto. Resultados equivalentes con alpacas han sido reportadas por Morton *et al.* (2010) obteniendo 92% de IA usando microscopía de fluorescencia (FICT-PSA), mientras que Cheuqueman *et al.* (2013) informaron de 88%, Santiani *et al.* (2016) de 93% y Ugarelli *et al.* (2017) de 88 a 95% empleando citometría de flujo (FITC-PSA). Los resultados del presente estudio (95-97%) sugieren que la mayoría de los espermatozoides mantienen su acrosoma intacto y podrían participar en el proceso de fecundación al atravesar la zona pelúcida del ovocito.

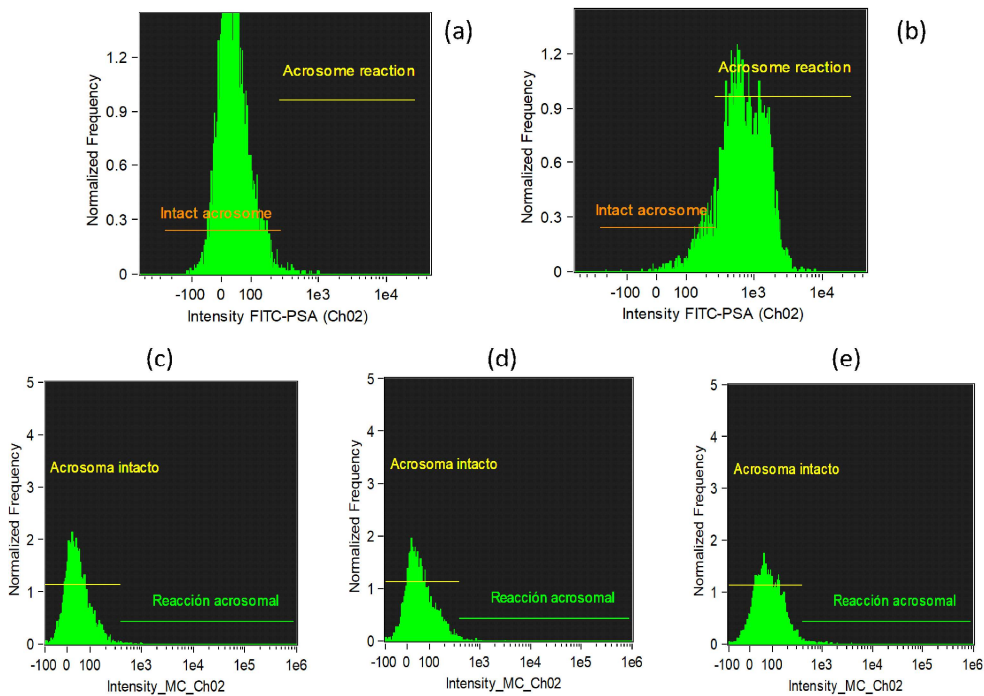


Figura 2. Histogramas de espermatozoides de alpacas obtenidos mediante citometría de flujo. (a) Autofluorescencia (Sin FITC-PSA); (b) Calcio ionóforo (Control positivo); (c) Muestras no fijadas evaluadas a las 0 horas; (d) Muestras fijadas con formaldehído 2% evaluadas a las 24 horas; (e) Muestras fijadas con formaldehído 2% evaluadas a una semana

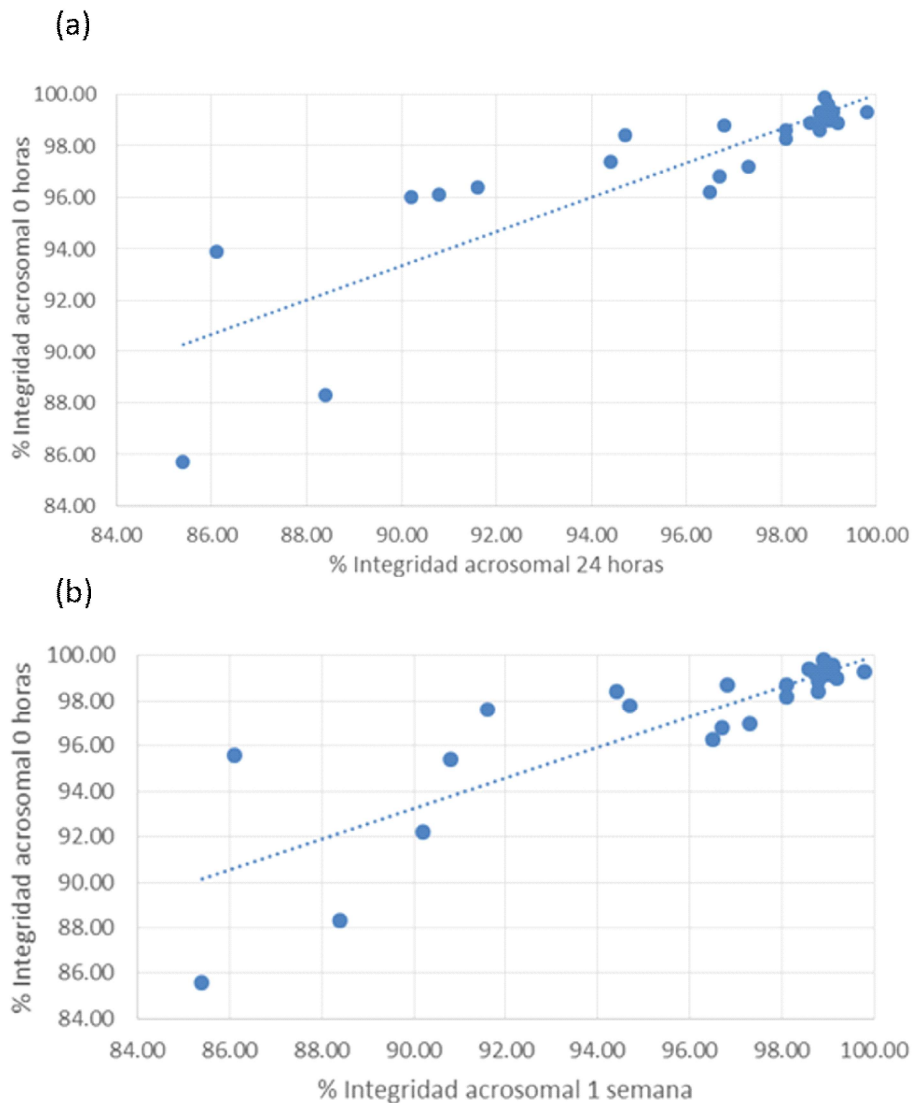
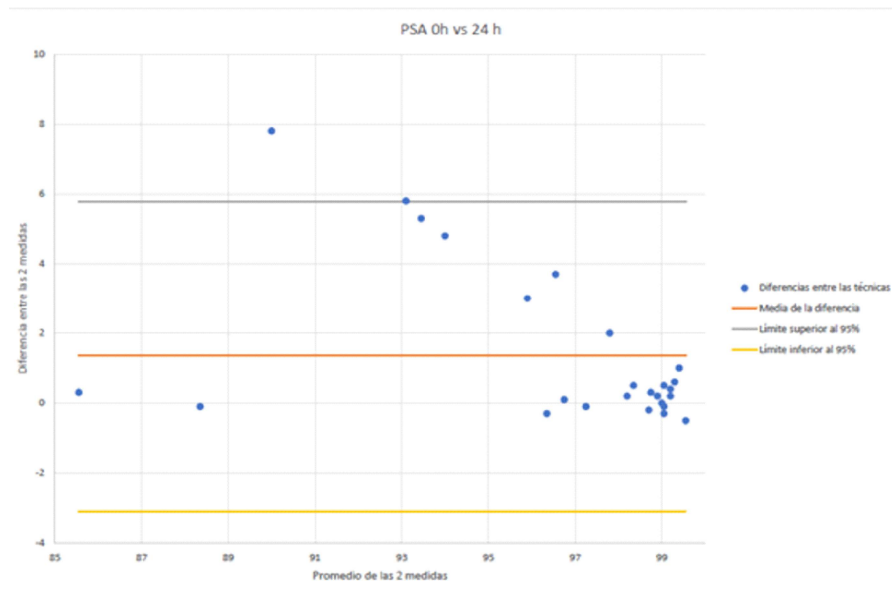


Figura 3. Gráfica de la integridad acrosomal con la dispersión de sus valores. (a) Evaluación a las 0 horas (eje Y) vs. evaluación a las 24 horas (eje X). (b): Evaluación a las 0 horas (eje Y) vs. evaluación a una semana (eje X)

En el presente estudio se compararon los niveles de IA en espermatozoides en tres periodos de almacenamiento utilizando citometría de flujo, indicando resultados similares entre los tres grupos de muestras, aunque con un ligero aumento en las muestras procesadas con formaldehído después de 24 h (97.9%) y 1 semana (97.2%) en comparación al control (95.89%). Además, para de-

terminar la asociación lineal entre las muestras frescas y las fijadas se trabajó con la correlación de Pearson, encontrando una fuerte correlación positiva ($r = 0.86$ y $r = 0.84$ para las muestras después de 24 h y 1 semana, respectivamente). Finalmente, se llevó a cabo una evaluación de gráficas (Bland y Altman) para evaluar la concordancia entre las pruebas, encontrando que los puntos se

(a)



(b)

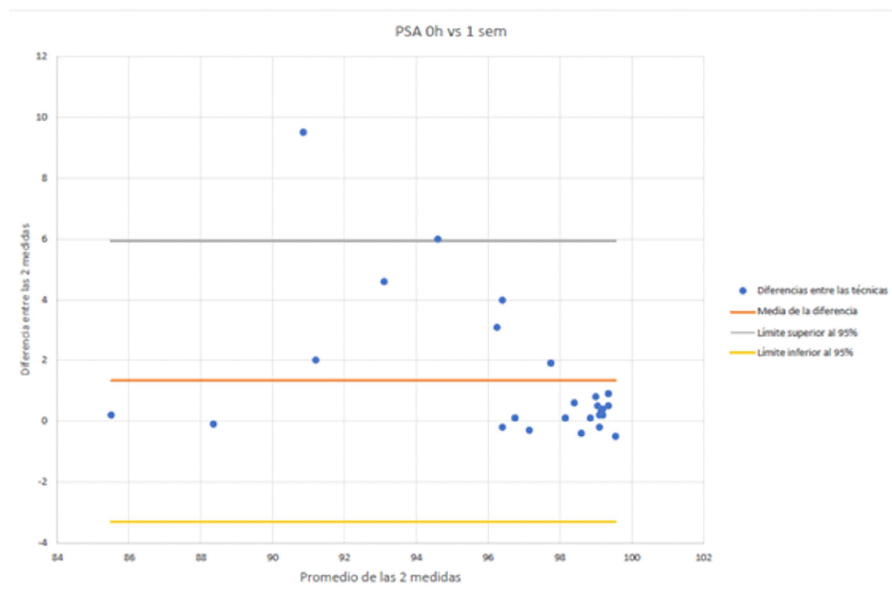


Figura 4. Gráfico para examinar concordancia entre la integridad acrosomal (%) de espermatozoides de alpaca (Figura de Bland y Altman). (a). Espermatozoides evaluados a las 0 h (no fijadas) vs. a las 24 h (fijadas Espermatozoides evaluados a), (b) Espermatozoides evaluados a las 0 h (no fijadas) vs. 1 semana (fijadas Espermatozoides evaluados)

encontraban dentro de los límites de concordancia, excepto un punto en cada gráfica. En general, los resultados sugieren que el análisis de la estructura acrosomal en muestras de espermatozoides fijadas podría reemplazar la evaluación de la muestra fresca sin afectar los resultados. Sin embargo, es importante tener en cuenta que se observó una ligera pérdida de fluorescencia a FITC-PSA en las muestras fijadas después de su manipulación y almacenamiento.

CONCLUSIONES

- Las muestras frescas no fijadas de espermatozoides de alpaca (0 horas) tienen una integridad acrosomal semejante a las muestras que fueron fijadas con formaldehído (24 horas y 1 semana).
- Es posible determinar el porcentaje de integridad acrosomal en espermatozoides de las alpacas hasta 7 días después de su obtención y fijación. Por tanto, se sugiere la posibilidad de evaluar la integridad acrosomal de las alpacas reproductoras sin tener que recurrir a un laboratorio cercano con tecnología avanzada y sin tener que transportar equipos frágiles y costosos a esas áreas.

LITERATURA CITADA

1. **Banda J, Evangelista S, Ruiz L, Sandoval R, Rodríguez C, Valdivia M, Santiani A, 2010.** Efecto de dilutores basado en Tris, Tes and leche descremada en criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. *Rev Inv Vet Perú* 21: 145–153. doi: 10.15381/rivep.v21i2.129
2. **Celeghini E, Nascimento J, Raphael C, Andrade A, Arruda R. 2010.** Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2: 536–543. doi: 10.1590/S0102-09352010000300006
3. **Cheuqueman C, Merino O, Giojalas L, Von Baer A, Sánchez R, Risopatrón J. 2013.** Assessment of sperm function parameter and DNA fragmentation in ejaculated alpaca sperm (*Lama pacos*) by flow cytometry. *Reprod Domest Anim* 48: 447–453. doi: 10.1111/rda.12096
4. **Gillan L, Evans G, Maxwell W. 2005.** Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 63: 445–457. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.09.024
5. **Glassner M, Jones J, Kligman I, Woolkalis M, Gerton G, Kopf G. 1991.** Immunocytochemical and biochemical characterization of guanine nucleotide-binding regulatory proteins in mammalian spermatozoa. *Dev Biol* 146: 438–450. doi: 10.1016/0012-1606(91)90245-x
6. **Harrison R. 1998.** Sperm evaluation: what should be testing? In: 6th MAFF International Workshop on Genetic Resources. Tsukuba, Japan.
7. **Hernández P, Fernández R, Rodríguez S, Negrete R, Soto M, García R. 2012.** Efecto de la criopreservación de semen de conejo Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) sobre su viabilidad y estado acrosomal. *Rev Salud Anim* 34: 188–191.
8. **Morton K, Bathgate R, Evans G, Maxwell W. 2007.** Cryopreservation of epididymal alpaca sperm: a comparison of citrate- Tris- and lactose-based diluents and pellets and straws. *Reprod Fertil Dev* 19:792–796. doi: 10.1071/RD07049
9. **Morton K, Evans G, Maxwell W. 2010.** 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* 74:311–316. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.02.015
10. **Risopatrón J, Peña P, Miska W, Sánchez R, 2001.** Evaluation of the acrosome reaction in human spermatozoa: comparison of cytochemical and

- fluorescence techniques. *Andrologia* 33, 63–67. doi: 10.1046/j.1439-0272.2001.00405.x
11. **Santiani A, Huanca W, Sapana R, Huanca T, Sepúlveda N, Sánchez R. 2005.** Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian J Androl* 7: 303-309. doi: 10.1111/j.1745-7262.2005.00021.x
 12. **Santiani A, Ugarelli A, Evangelista-Vargas S. 2016.** Characterization of functional variables in epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm using imaging flow cytometry. *Anim Reprod Sci* 173: 49-55. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.08.010
 13. **Siciliano L, Marciano V, Carpino A. 2008.** Prostate-like vesicles stimulate acrosome reaction of pig spermatozoa. *Reprod Biol Endocrinol* 6: 5. doi: 10.1186/1477-7827-6-5
 14. **Ugarelli A, Evangelista-Vargas S, Santiani A. 2017.** Evaluación de la integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios de alpaca mediante citometría de flujo. *Rev Inv Vet Perú* 28: 130-140. doi: 10.15381/rivep.v28i1.1947
 15. **Yanagimachi R. 1994.** Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neil J (eds). *Physiology of reproduction*. New York: Ed Knobil. p 189-317.