

RELACIÓN DE LAS ACUAPORINAS 3, 7, Y 11 CON LA CRIOTOLERANCIA EN EL ESPERMATOZOIDE EQUINO

Sebastián Bonilla-Correal^{1, 2, *}, Federico Noto¹, Estela Garcia-Bonavila³, Joan E. Rodriguez-Gil¹, Marc Yeste³, Jordi Miro¹

¹Departament de Medicina i Cirurgia Animal, Universitat Autònoma de Barcelona

²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Antonio Nariño, Colombia

³Biotechnologia de la Reproducció Animal i Humana (TechnoSperm), Departament de Biologia, Universitat de Girona

*sebastian.bonilla@e-campus.uab.cat

Resumen

Estudios previos han demostrado que las acuaporinas 3 (AQP3), 7 (AQP7) y 11 (AQP11) están presentes en los espermatozoides de ratón, humano, bovino y porcino y juegan un papel relevante en la resistencia de estas células a la criopreservación. En este trabajo, se determinó, en primer lugar, si dichas proteínas se hallaban en el espermatozoide de equino. En segundo lugar, se estudió si los niveles relativos de cada una de estas acuaporinas en el semen fresco estaban relacionados con la criotolerancia espermática, evaluada sobre la base de la motilidad y la viabilidad espermáticas después de la descongelación. De un lado, se observó que las tres acuaporinas estaban presentes en el espermatozoide equino. Por otra parte, se establecieron dos grupos de eyaculados según su criotolerancia y se observó que los eyaculados de elevada congelabilidad (GFE) presentaban unos niveles significativamente superiores de AQP3 y AQP11 en comparación con los de baja congelabilidad (PFE). En conclusión, este estudio ha confirmado la presencia de las acuaporinas 3, 7 y 11 en el espermatozoide de caballo y se ha demostrado que la AQP3 y la AQP11 están relacionadas con su criotolerancia.

Palabras clave: espermatozoide, AQP3, AQP7, AQP11, criopreservación, equino.

Abstract

Previous studies performed have demonstrated that aquaporins 3 (AQP3), 7 (AQP7) and 11 (AQP11) are present in mouse, human, pig and cattle sperm and play a pivotal role for their resilience to withstand freeze-thawing procedures (cryotolerance or freezability). Against this background, the current study aimed at a) determining the presence of these three proteins in stallion sperm and, b) studying the relationship of their relative abundance in fresh semen with sperm cryotolerance, evaluated as motility and viability at post-thawing. On the one hand, the three proteins were found to be present in stallion sperm by immunoblotting. On the other hand, and after establishing two groups of ejaculates based upon their sperm cryotolerance (good, GFE, and poor freezability ejaculates, PFE), relative AQP3- and AQP11-content in stallion fresh semen was found to be significantly higher in GFE than in PFE. In conclusion, the current study has confirmed the presence of AQP3, AQP7 and AQP11 in stallion sperm, and has also demonstrated that AQP3 and AQP11 are involved in their cryotolerance.

Key words: sperm, AQP3, AQP7, AQP11, cryopreservation, equine.

INTRODUCCIÓN

Las acuaporinas son proteínas transmembrana involucradas en el tránsito de agua y pequeños solutos (Agre 2004; Sales et al., 2013). Hay tres grupos diferentes de acuaporinas que se distinguen por su permeabilidad al agua y a otros solutos y por su secuencia de aminoácidos (Agre et al., 2002; Ishibashi et al., 2009). Las acuaporinas se han encontrado en varios tejidos y órganos y también en el tracto reproductivo tanto de machos como hembras de diferentes especies (Thoroddsen et al.,

2011). En lo que concierne a los espermatozoides, estudios previos han hallado las acuaporinas 3 (AQP3), 7 (AQP7) y 11 (AQP11) en varias especies: ratón, humano, porcino y bovino (Yeung et al., 2009; 2010; Prieto-Martínez et al., 2015, 2016a; 2016b).

Con todo, el interés de estas proteínas no sólo radica en su función fisiológica como transportadores de agua sino también en su potencial implicación en la criotolerancia, dada la relevancia del tráfico del agua y los crioprotectores permeables (como el glicerol). Dado que no se ha llevado a cabo ningún estudio sobre la presencia

de las acuaporinas en el espermatozoide de caballo, el presente trabajo tuvo como objetivos: a) determinar la presencia de las AQP3, AQP7 y AQP11 en el espermatozoide de caballo, y b) estudiar la relación de los contenidos relativos de dichas proteínas en el semen fresco y la criotolerancia de dicho espermatozoide.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

Excepto en los casos en los que no se indique de otro modo, los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EE.UU.) y los fluorocromos de Molecular Probes/Invitrogen (Eugene, Oregon, EE.UU.).

Muestras seminales

Se utilizaron un total de cinco eyaculados de sementales sanos de pura raza española estabulados en el Servicio de Reproducción Equina de la Universidad Autónoma de Barcelona. Dichos sementales fueron alimentados con heno y concentrado comercial para caballos y agua *ad libitum*. El semen fue extraído con vagina artificial tipo Hannover y congelado con crioprotector (Botucio, Sao Paulo, Brasil) en pajuelas de 0,5 ml usando un bio-congelador (Ice-Cube programmable freezer; Minitub Ibérica, Tarragona). Antes de la congelación de las muestras se tomó una alícuota que se utilizó para la extracción de proteínas y el análisis por Western blot subsecuentes.

Extracción de proteínas y Western blot

La alícuota destinada a la extracción de proteínas se centrifugó a 600×g durante 10 min a 4°C. Este pellet fue después resuspendido con 400 µl de tampón de lisis compuesto por SDS (2%), Triton X-100 (1%), Urea (8 M), DTT (2 mM), Tween 20 (0,5%), Tris-HCl (50 mM), cóctel inhibidor de proteasas (1%), PMSF (0,1 M) y ortovanadato de sodio (700 mM). Después de la resuspensión fue sonificado tres veces con 5 pulsos cada 2 minutos (SONO-PLUS ultrasonic homogenizer HD 2070; Bandelin, Berlin, Germany). Seguidamente, la muestra se centrifugó a 10.000×g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue meticulosamente colectado y cuantificado mediante el kit DC Protein assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA EE.UU.).

Para la separación con electroforesis en gel de poliacrilamida y sulfato dodecil de sodio (SDS-PAGE), se utilizaron 10 µg de proteína total para cada muestra. Antes de la electroforesis, las muestras y el marcador

molecular fueron hervidos a 90°C durante cinco minutos y cargados en el gel. El gel separador contuvo 12 % de acrilamida, y el apilador 5%.

Después de correr el gel durante aproximadamente 90 minutos, las bandas de proteína fueron transferidas en membranas de polivinilideno fluorado (MB) durante 2 horas a 120 mA. Finalmente, las membranas se incubaron con solución de bloqueo y agitadas (5% BSA en TBS 1×) a 4°C durante toda la noche.

Las membranas bloqueadas se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios: Anti-Aquaporin 3 antibody ab 125219 (Abcam® PLC, Cambridge, Massachusetts, EE.UU.) en dilución 1:300; Aquaporin-7 Antibody (NBP1-30862 novus biologicals, Littleton, Colorado, EE.UU.) en dilución 1:1000; y AQP11 antibody (orb36094 Biorbyt, Cambridge, Reino Unido) en dilución 1:300 en solución de bloqueo durante una hora y con agitación. Seguidamente, se realizaron tres lavados de las membranas de cinco minutos cada uno. Después fueron incubadas con horseradish peroxidase (HRP)-conjugated polyclonal anti-rabbit immunoglobulin (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dinamarca) durante una hora a diferentes diluciones: AQP3 (1:4000), AQP7 (1:10000) y AQP11 (1:5000).

Posteriormente, cada membrana se lavó cinco veces (cinco minutos cada lavado). Las bandas reactivas fueron visualizadas con sustrato de quimioluminiscencia (Immobilon Western Detection Reagent; Milipore, Alemania), un sistema de imagen quimioluminiscencia Syngene y un software de adquisición de la imagen Genesys (Synoptics Limited, Cambridge, Reino Unido). Se identificaron para cada acuaporina, dos bandas proteicas (una a 30 kDa y otra a 60 kDa), que fueron escaneadas y cuantificadas mediante el software Quantity One Software (Version 4.6.2; Bio-Rad). Los valores se expresaron como la intensidad de la señal dentro de los límites de la banda evaluada en número de píxeles (densidad, mm²). La señal de fondo fue evitada y la baja intensidad de píxel fue considerada como 0 (blanco; Vilagran et al., 2013). La α -tubulina fue usada para normalizar el contenido relativo de cada AQP.

Motilidad y viabilidad espermáticas

La motilidad espermática fue evaluada usando un sistema de análisis computerizado (CASA) y la viabilidad espermática fue determinada mediante citometría de flujo, sobre la base de la integridad de la membrana espermática (SYBR 14/yoduro de propidio (IP) a las 0 y 2 horas después de la descongelación (incubación a 37°C). En este último caso se utilizó el kit LIVE/DEAD y los espermatozoides verdes (SYBR14⁺/IP⁻) se consideraron viables y los rojos (SYBR14⁺/IP⁺) y naranjas (SYBR14⁺/IP⁺) se consideraron como no viables. Se

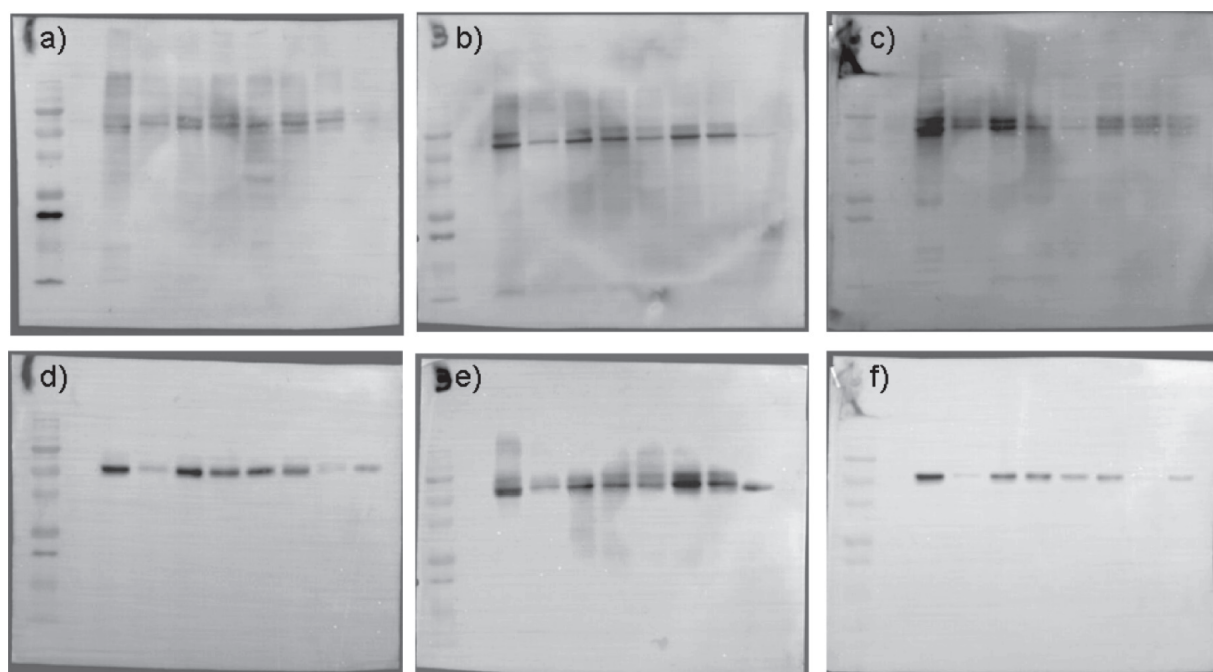


Figura 1 Inmunoblots representativos de las tres acuaporinas: AQP3 (a), AQP7 (b) y AQP11 (c), junto con sus respectivos resultados de stripping y revelado con α -tubulina (d, e y f). En todas las acuaporinas, se observaron bandas a 30 kDa y 60 kDa, siendo la segunda la más importante.

evaluaron tres réplicas de cada muestra y en cada caso se analizaron 10.000 espermatozoides (eventos).

Análisis estadístico de los resultados

Para el análisis estadístico se utilizó un paquete estadístico (IBM SPSS 21.0 para Windows; IBM, Chicago, Illinois, EE.UU.). Se comprobaron la normalidad y la homogeneidad de varianzas y se estableció una clasificación de eyaculados mediante análisis de clústeres en dos fases y con la distancia logarítmica como medida de similitud. Los parámetros que se utilizaron fueron la motilidad y la viabilidad espermáticas después de descongelar (0h y 2h). Una vez establecidos los dos grupos de eyaculados según la congelabilidad (GFE y PFE), se compararon los niveles relativos de AQP3, AQP7 y AQP11 entre ellos mediante un test *t* de medidas independientes. El nivel de significación se estableció en $P \leq 0.05$.

RESULTADOS

Presencia de las acuaporinas AQP3, AQP7 y AQP11

Mediante los inmunoblots para AQP3, AQP7 y AQP11, se confirmó la presencia de estas tres proteínas en el

semen fresco de caballo, tal y como muestra la Figura 1. En todos los casos se observaron banda a 30 y 60 kDa, siendo la densidad de la segunda superior a la de la primera.

Clasificación de los eyaculados según su congelabilidad

De los 5 eyaculados analizados, 3 resultaron ser buenos congeladores (GFE) y 2 fueron malos congeladores (PFE). La Tabla 1 muestra las medias $\pm$ los errores estándar de la media (SEM) para la viabilidad y la motilidad espermáticas inmediatamente después de descongelar (0h) y a las 2h post-descongelación.

Tabla 1 Viabilidad y motilidad total de los espermatozoides en los eyaculados de alta (GFE) y baja (PFE) congelabilidad inmediatamente después de su descongelación (0h) y después de incubar a 37°C durante 2h.

Parámetro	Tiempo	GFE	PFE
Viabilidad espermática	0h	29,4 $\pm$ 2,1	14,7 $\pm$ 1,6
	2h	20,3 $\pm$ 2,7	4,1 $\pm$ 2,3
Motilidad espermática total	0h	29,6 $\pm$ 2,6	13,9 $\pm$ 2,7
	2h	14,1 $\pm$ 2,9	4,7 $\pm$ 0,3

Relación entre la congelabilidad y los niveles relativos de AQP3, AQP7 y AQP11

La Figura 2 muestra (como media $\pm$ SEM) los niveles relativos de ambas bandas identificadas (30 y 60 kDa) para cada acuaporina (AQP3, AQP7 y AQP11) y para los eyaculados de buena (GFE) y mala congelabilidad (PFE).

En el caso de las bandas de 30 kDa, cuyas densidades, como se ha apuntado previamente, fueron inferiores a las de 60 kDa, solo se observaron diferencias significativas en el caso de la AQP11. Por otra parte, y en lo que concierne a las bandas de 60 kDa, los eyaculados de buena congelabilidad presentaron niveles relativos de AQP3 y AQP11 superiores a los de mala congelabilidad ($P < 0.05$). En el caso de la AQP7, no se observaron diferencias significativas.

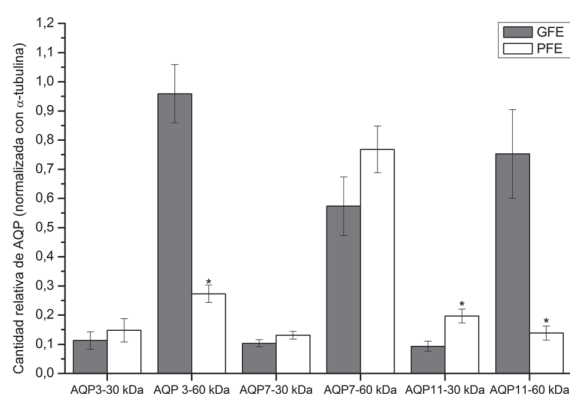


Figura 2 Cantidad relativa (normalizada con α -tubulina; media $\pm$ SEM) de las bandas de 30 kDa y 60 kDa de AQP3, AQP7 y AQP11 en los eyaculados de buena (GFE) y mala congelabilidad (PFE). El asterisco (*) indica diferencias significativas ($P < 0.05$) entre GFE y PFE.

DISCUSIÓN

Las acuaporinas juegan un papel fundamental para el tránsito del agua y otros solutos, incluidos los crioprotectores permeables como el glicerol (Agre *et al.*, 2002). En este trabajo, se reporta, por primera vez, la presencia de las acuaporinas 3, 7 y 11 en el espermatozoide equino. Hay que destacar que en todos los casos se observaron dos bandas, una de 30 kDa y otra de 60 kDa, lo que sugiere la presencia de formas diméricas o de agregados de dichas proteínas después de la extracción. En cualquier caso, es importante mencionar aquí que la especificidad de los anticuerpos utilizados fue verificada mediante péptidos de bloqueo en estudios previos del grupo de investigación (Prieto-Martínez *et al.*, 2014; 2015; 2016).

Por otra parte, se ha determinado que los eyaculados buenos y malos congeladores difieren en sus niveles relativos de AQP3 y AQP11. Ello sugiere que la mayor presencia de estas proteínas en el espermatozoide equino le confiere una mayor resistencia a la criopreservación. En cambio, los niveles relativos de AQP7 no difieren entre grupos de congelabilidad. Estos resultados están de acuerdo, en parte, con lo obtenidos en porcino y bovino, pues la AQP3 ha sido identificada como marcador de congelabilidad en porcino (Prieto-Martínez *et al.*, 2015) y la AQP11 en bovino (Prieto-Martínez *et al.*, 2016b). Sin embargo, mientras que estudios previos han reportado que los niveles relativos de AQP7 en semen fresco están relacionados con la congelabilidad del semen de porcino y bovino (Prieto-Martínez *et al.*, 2016a; 2016b), no se han hallado diferencias entre GFE y PFE en este estudio. Dicho esto, hay que mencionar que se observó una tendencia a favor de los PFE. Con todo, y dado que el tamaño muestral de este estudio es bajo, hace falta replicar el presente diseño experimental en un mayor número de casos para confirmar estos resultados que, aún, tienen carácter preliminar.

En conclusión, en este trabajo se ha demostrado, por primera vez, que las AQP3, AQP7 y AQP11 se encuentran en el espermatozoide de caballo. Además, los primeros resultados indican que hay una relación entre los niveles relativos de AQP3 y AQP11 y la criotolerancia del espermatozoide equino. Estudios futuros deben ampliar el universo muestral, incluyendo más réplicas biológicas, y deben también contemplar ensayos de inmunolocalización para estas tres proteínas.

REFERENCIAS

- Agre, P. (2004). Aquaporin water channels (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 43, p. 4278-4290.
- Agre, P.; King, L.S.; Yasui, M.; Guggino, W.B.; Ottersen, O.P.; Fujiyoshi, Y.; Engel, A.; Nielsen, S. (2002). Aquaporin water channels – from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol*, vol. 542, p. 3-16.
- Ishibashi, K.; Hara, S.; Kondo, S. (2009). Aquaporin water channels in mammals. *Clin Exp Nephrol*, vol. 13, p. 107-117.
- Prieto-Martínez, N.; Morató, R.; Vilagran, I.; Rodríguez-Gil, J.E.; Bonet, S.; Yeste, M. (2015). Aquaporins in boar spermatozoa. Part II: detection and localization of Aquaglyceroporin 3. *Reprod Fertil Dev*, doi: 10.1071/RD15164.
- Prieto-Martínez, N.; Vilagran, I.; Morató, R.; Rodríguez-Gil, J.E.; Yeste, M.; Bonet, S. (2016a). Aquaporins 7 and 11 in boar spermatozoa: detection, loca-

- lization and relationship with sperm quality. *Reprod Fertil Dev* vol. 28, p. 663-672.
- Prieto-Martínez, N.; Morató, R.; Muiño, R.; Hidalgo, C.O.; Rodríguez-Gil, J.E.; Bonet, S.; Yeste, M. (2016b). Aquaglyceroporins 3 and 7 in bull spermatozoa: identification, localisation and their relationship with sperm cryotolerance. *Reprod Fertil Dev*, doi:10.1071/RD16077.
- Sales, A.D.; Lobo, C.H.; Carvalho, A.A.; Moura, A.A.; Rodrigues, A.P.R. (2013). Structure, function and localisation of aquaporins: their possible implications on gamete cryopreservation. *Gene. Mol Res*, vol. 12, p. 6718-6732.
- Throddsen, A.; Dahm-Kahler, P.; Lind, A.K.; Weijdegard, B.; Lindenthal, B.; Müller, J.; Brannstrom, M. (2011). The water permeability channels aquaporins 1-4 are differentially expressed in granulosa and theca cells of the preovulatory follicle during precise stages of human ovulation. *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 96, p. 1021-1028.
- Vilagran, I.; Castillo, J.; Bonet, S.; Sancho, S.; Yeste, M.; Estanyol, S.M.; Oliva, R. (2013). Acrosin-binding protein (ACRBP) and triosephosphate isomerase (TPI) are good markers to predict boar sperm freezing capacity. *Theriogenology*, vol. 80, p. 443-450.
- Yeste, M.; Estrada, E.; Rocha, L.G.; Marin, H.; Rodríguez-Gil, J.E.; Miró, J. (2014). Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. *Andrology*, vol. 3, p. 395-407.
- Yeung, C.H.; Callies, C.; Rojek, A.; Nielsen, S.; Cooper, T.G. (2009). Aquaporin isoforms involved in physiological volume regulation of murine spermatozoa. *Biol Reprod*, vol. 80, p. 350-357.
- Yeung, C.H.; Callies, C.; Tüttelmann, F.; Kliesch, S.; Cooper, T.G. (2010). Aquaporins in the human testis and spermatozoa - identification, involvement in sperm volume regulation and clinical relevance. *Int J Androl*, vol. 33, p. 629-641.

