

ACTIVIDAD DE LDH-X EN EL ESPERMATOZOIDE BOVINO EN RELACION CON LA INTEGRIDAD ACROSOMAL

C. O'Flaherty¹
G. Trincheró²
L. Pintos³
M. Beconi⁴

RESUMEN

Se determinó la actividad de LDH-X como posible indicador metabólico de integridad de membrana y se realizaron estudios de correlación entre actividad enzimática y parámetros observables por microscopía óptica y de contraste interferencial-diferencial (DIC). La extracción enzimática se realizó por shock osmótico-térmico a partir de espermatozoides de semen fresco y congelado de toros Holando Argentino, incubadas a 37°C durante dos horas. La actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente a 340 nm. En semen fresco se observa un decaimiento del 80% en la actividad enzimática y del 37% en el porcentaje de acrosoma intacto, durante la realización del test de termorresistencia. En base a estos resultados pudo observarse una alta correlación entre la actividad de LDH-X y el porcentaje de acrosoma intacto ($r=0,81; p<0.01$), mientras que estudiando la correlación entre actividad de LDH-X y número de espermatozoides se halló un $r=0,66$ ($p<0.01$). En semen congelado sometido al mismo test no hubo diferencias significativas en la actividad enzimática y se observó una disminución del 40% en el porcentaje de acrosoma intacto durante la incubación. El menor porcentaje de acrosoma intacto del semen congelado frente al del fresco sería el producto de alteración previa de membrana por el congelamiento profundo. La actividad enzimática hallada en plasma seminal está correlacionada con el porcentaje de acrosoma intacto - ($r= - 0,33; p<0.1$). Los resultados obtenidos indicarían que la actividad de LDH-X podría ser utilizada como índice de calidad espermática.

¹Becario de Investigación-UBA

²Jefe de Trabajos Prácticos

³Jefe de Trabajos Prácticos

⁴Profesora Asociada a Cargo, Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Chorroarín 280,(1427) Buenos Aires. República Argentina.

INTRODUCCION

La isoenzima X o C4 de la lactato deshidrogenase es específica de testículo y espermatozoides de muchas especies (Blanco y col., 1963; Goldberg, E, 1963; Zinkham y col., 1964). Comienza a ser detectada en el estado paquitene de espermatoцитos primarios (Goldberg, 1977; Hintz y col., 1977). En espermatozoides maduros representa más del 80% de actividad LDH total (Zinkham y col., 1963; Blanco, 1980). El 90% de actividad total de LDH-X es extramitocondrial (Storey, 1977); encontrándose más del 80% de LDH-X en la fase soluble del citosol (Wang y col., 1990; Blanco, 1977); siendo sólo del 2 al 6% la actividad total intramitocondrial (Storey, 1977). En espermatozoides de toros se la halló en la matriz mitocondrial (Blanco y col., 1976). También se halló un 10% de la actividad total de LDH-X asociada a la membrana plasmática (Wang y col., 1990).

Por técnicas histoquímicas se determinó que se encuentra en una zona extra-mitocondrial en proximidad a la membrana plasmática en la pieza intermedia de espermatozoides (Baccetti y col., 1975). En espermatozoides de ratón se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-LDH-X y se vio que éstos se unían a la cola, mientras que en espermatozoides humanos lo hacían a la región post-acrosomal, cuello y pieza intermedia (Wang y col., 1990).

En estudios electroforéticos se determinaron, en testículo de bovino 3 bandas X: una entre LDH-3 y LDH-4 y dos entre LDH-4 y LDH-5 (Zinkham, 1963). En plasma seminal se encontró actividad LDH-X, posiblemente por liberación de la enzima por espermatozoides lesionados o muertos o quizás por secreción de células epiteliales de las vías eyaculatorias (Zinkham y col., 1964), pero Skude et al, 1984, determinaron que sólo las células germinales sintetizan LDH-X, descartando a las vesículas seminales y próstata como fuentes de esta isoenzima. La LDH-X está relacionada con la fertilidad debido a que participa en el metabolismo energético de espermatozoides maduros (Blanco, 1980).

En semen humano mostró estar asociada a la disminución parcial o total de la motilidad espermática (Gavella y col., 1985). En hembras de ratones y babuinos se logró supresión de la fertilidad inmunizándolas con LDH-X de ratón (Goldberg, 1973; Lerum y col., 1974; Goldberg y col., 1981).

En leucocitos existe correlación entre la producción de malondialdehído y la liberación del LDH al medio de incubación, pudiéndose utilizar la actividad de esta enzima como indicador del daño celular (Pascoe y col., 1987).

La integridad del acrosoma es fundamental para lograr la fertilización del ovocito por parte del espermatozoide, y está relacionada con la capacitación y el potencial de fertilización. El daño del acrosoma está considerado como una de las tantas causas de infertilidad en el hombre (Zamboni, 1987; Schill y col., 1988 y Wolf, 1989). En el bovino no se ha observado que espermatozoides móviles presenten daño acrosomal (Salisbury, 1978) estableciéndose de porcentaje de acrosoma intacto (%AI) como parámetro morfológico de viabilidad post-descongelación del semen; dicho parámetro tiene alta correlación con la fertilidad (Saacke, 1972). Conociendo la importancia de la integridad acrosomal en el proceso de fertilización, se intenta correlacionar el %AI con la actividad de LDH-X del espermatozoide bovino durante el test de termorresistencia.

MATERIALES Y METODOS

Preparación de las muestras:

En esta experiencia se utilizó un pool de dos eyaculados provenientes de toros Holando Argentino, obtenidos con vagina artificial en servicio de rutina. La concentración espermática osciló entre 0.8 y 1.2 x 10⁹ espermatozoides/ml, con 70% de motilidad progresiva. Cada pool de semen se dividió en dos fracciones: una se mezcló en proporción 1:2 con buffer tris-citratoglicina-fructosa con 20% de yema de huevo y 7% de glicerol a 20%. Las suspensiones obtenidas se enfriaron lentamente durante 4 horas hasta alcanzar 5°C. Con el semen diluido y enfriado se prepararon pastillas (pellets) sobre hielo seco, las cuales se sumergieron en nitrógeno líquido; la otra fracción fue utilizada como control fresco. El número de espermatozoides fue determinado por recuento en cámara de

Test de termorresistencia:

Los espermatozoides provenientes de semen fresco fueron centrifugados a 3000 g durante 10 minutos a 4°C, el plasma seminal obtenido fue conservado a -20°C y el pellet se resuspendió en el buffer de incubación (buffer Ringer con 1% de fructosa). Los espermatozoides fueron incubados a 37°C durante 2 horas. A tiempo 0, 1 y 2 horas se retiraron alícuotas para preparar el extracto enzimático y para la observación del %AI. El semen congelado se diluyó en buffer Ringer a 37°C y luego se sometió al mismo tratamiento que el semen fresco.

Aislamiento de la enzima:

Los extractos enzimáticos conteniendo LDH-X se prepararon utilizando una modificación de los métodos de Battellino y col., 1968) y Zinkham y col., 1968). La alícuota correspondiente a tiempo 0 de semen fresco se centrifugó a 3000g durante 10 minutos a 4°C para remover el buffer de incubación; al pellet obtenido se le adicionó agua bidestilada hasta completar volumen. Los espermatozoides resuspendidos en agua bidestilada fueron congelados a -20°C durante 2 horas, se descongelaron a temperatura ambiente y se llevaron nuevamente a -20°C hasta el momento de la medición de la actividad enzimática en que fueron centrifugados a 20000 g durante 15 minutos a 4°C, utilizándose el sobrenadante para la medición. Las alícuotas correspondientes a 1 y 2 horas de semen fresco y las alícuotas correspondientes a semen congelado fueron procesadas de igual forma.

Medición de la actividad enzimática:

La actividad de LDH-X fue determinada espectrofotométricamente por el registro del cambio de absorbancia a 340 nm producido por la oxidación de NADH (Blanco y col., 1976). Se consideró una unidad enzimática a la cantidad de la misma que produce un cambio de absorbancia de 2.07/minuto a 340 nm y que representa la oxidación de un μmol de NADH. Los resultados se expresaron en $\text{UE}/10^{10}$ espermatozoides.

Evaluación microscópica:

A tiempo cero se realizó la determinación de motilidad de masa, porcentaje de espermatozoides vivos y muertos y motilidad progresiva por microscopía óptica y el %AI en semen fresco y congelado. El %AI se determinó por microscopía óptica de contraste interferencial-diferencial (DIC) (Saacke y col., 1968; Aalseth y col., 1985; Aalseth y col., 1986) a partir de muestras conservadas según modificación del método de Johnson y col., 1976. Fueron considerados espermatozoides normales con acrosoma intacto a aquellos que presentaban acrosomas con superficie lisa y borde apical nítido (Johnson y col., 1976; Aalseth y col., 1985; Barth, 1989 y Wheeler y col., 1989). La presencia de superficie acrosomal irregular, hinchamiento (swelling), ausencia de borde apical nítido o falta total de acrosoma, fueron considerados como daño acrosomal (Aalseth, 1985). A 1 y 2 horas de incubación fueron retiradas alícuotas para la evaluación acrosomal. Las determinaciones de %AI fueron realizadas por el mismo observador contando 200 células por muestra.

RESULTADOS

La tabla A y el gráfico I muestran el decaimiento de la actividad relativa de LDH-X durante la incubación, del semen fresco y congelado, durante el test de termorresistencia, observándose una caída del 77% en semen fresco a las 2 horas, mientras que en semen congelado no hubo diferencias significativas en la actividad a los distintos tiempos de incubación. En semen congelado se observó una mayor actividad de LDH-X que en semen fresco ($p < 0,025$). En la tabla B se muestran los valores de %AI en semen fresco y congelado durante el test de termorresistencia. En el gráfico 2 se observa el decaimiento del %AI en semen fresco y congelado, siendo el %AI inicial del semen congelado aproximadamente el 50% del valor en semen fresco, lo que indicaría el daño producido por el congelamiento profundo. Existe correlación positiva ($r=0.81$) entre actividad de LDH-X y el %AI en muestras de semen fresco sometidas a test de termorresistencia ($p < 0.01$) (gráfico 3).

La correlación positiva entre la actividad de LDH-X y concentración espermática fue $r=0.66$ ($p < 0.01$). Según se observa en el gráfico 4.

BIBLIOGRAFIA

- AALSETH, E.P. & SAACKE, R.G. Morphological change of the acrosome on motile bovine spermatozoa due storage at 4°C. *J Reprod Fert* 74:473-478, 1985.
- AALSETH, E.P. & SAACKE, R.G. Vital staining and acrosomal evaluation of bovine sperm. *Gamete Res* 15:73-81, 1986.
- BARTH, A.D. Evaluation of frozen bovine semen. *Proc. Annual Meeting-Society for Teriogenology*, 1989.
- BLANCO, A. On the functional significance of LDH-X. *The Johns Hopkins Medical Journal* 146:231-235, 1980.
- GEREZ DE BURGOS, N.M.; BURGOS, C.; CORONEL, C.E.; BERTARELLI DE CAMUSSO, A.; PIGINI, T. & BLANCÓ, A. Correlation of lactate dehydrogenase isoenzyme C₄ activity with the count and motility of human spermatozoa. *J Reprod* 55:107-111, 1973.
- HEALEY, P. Effect of freezing on the ultrastructure of the spermatozoon of some domestic animals. *J Reprod Fert* 18:21-27, 1969.
- JOHNSON, J; BERNDTSON, W.E. & PICKETT, B.W. An improved method for evaluating acrosomes of bovine spermatozoa. *J Anim Sci* 42:951-954, 1976.
- JONES, R.C. & STEWART, D.L. The effects of cooling to 5°C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa. *J Reprod Fert* 56: 233-238, 1979.
- KELTIMLIDIS, K.; PAPANIMAS, J.; BONTIS, J. & MANTALENAKIS, S. LDH isoenzymes in semen of infertile men. *Arch Androl* 22:77-84, 1989.
- SAACKE, R.G. & White, J.M. Semen quality test and their relationship to fertility. *Proc. 4th NAAB Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod. Chicago*, p 22-27, 1972.
- SAACKE, R.G. & MARSHALL, C.E. Observations on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa. *J Reprod Fert* 16:511-514, 1968.
- SCHILL, W.B.; Topfer-Petersen, E. & Heissler, E. The sperm acrosome: functional and clinical aspects. *Hum Reprod* 3:139-145, 1988.
- TASSERON, F. Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *J Reprod Fert* 51:461, 1977.
- WHEELER, MB; SEIDEL, GE. Capacitation of bovine spermatozoa by lysophospholipids and trypsin. *Gamete Res* 22:193-204, 1989.
- WOLF, D.P. Acrosomal status quantitation in human sperm. *AJRI* 20:106-113, 1989.
- ZAMBONI, L. The ultrastructural pathology of the espermatozoon as a cause of infertility: the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality. *Fertil Steril* 48:711-734, 1987.

TABLAS Y GRAFICOS

Tabla A - ACTIVIDAD DE LDH-X EN SEMEN BOVINO DURANTE EL TEST DE TERMORRESISTENCIA

	UF/10 ¹⁰ espermatozoides		Actividad relativa
	Promedio	DS	(%)
Semen fresco			
0 hora	20	7.89	100
1 hora	7.13	5.66	36
2 horas	4.56	4.50	23
Semen congelado			
0 hora	39.88	18.14	100
1 hora	42	20.08	105.32
2 horas	36.50	11.38	92

Tabla B - PORCENTAJE DE ACROSOMA INTACTO EN SEMEN BOVINO DURANTE EL TEST DE TERMORRESISTENCIA.

	Promedio	DS
Semen fresco		
0 hora	89	7.09
1 hora	77.13	6.99
2 horas	59.50	9.52
Semen congelado		
0 hora	44.75	9.30
1 hora	32.63	9.10
2 horas	26.38	9.83

ACTIVIDAD DE LDH-X EN SEMEN BOVINO
TEST DE TERMORRESISTENCIA

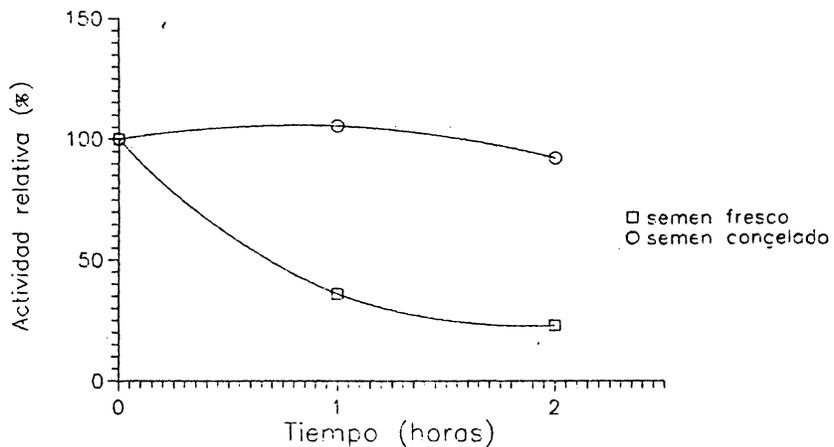


grafico 1

ACROSOMA INTACTO EN SEMEN BOVINO
TEST DE TERMORRESISTENCIA

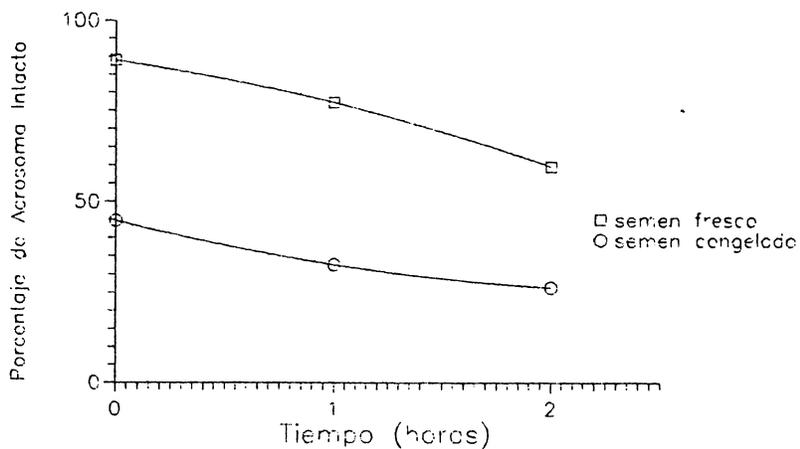


grafico 2

CORRELACION ENTRE ACTIVIDAD DE LDH-X Y PORCENTAJE DE ACROSOMA INTACTO EN SEMEN BOVINO FRESCO

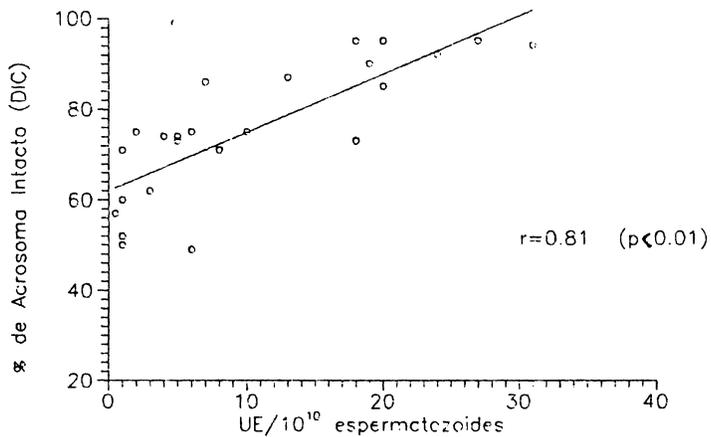


grafico 3

CORRELACION ENTRE ACTIVIDAD DE LDH-X Y NUMERO DE ESPERMATOZOIDES EN SEMEN BOVINO FRESCO

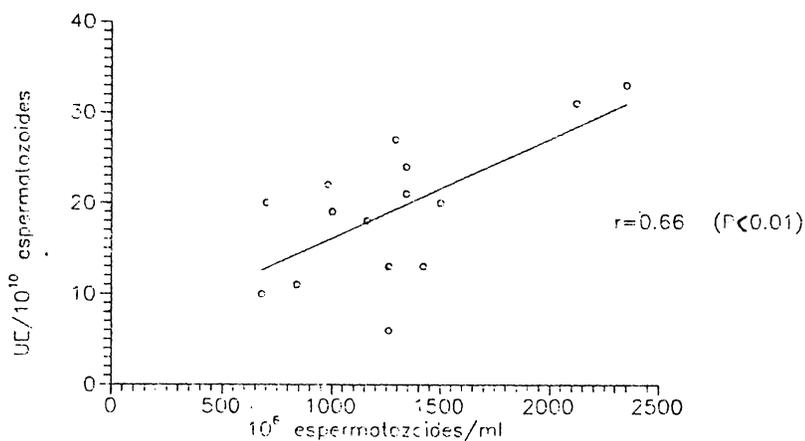


grafico 4

CORRELACION ENTRE ACTIVIDAD DE LDH-X Y PORCENTAJE DE ACROSOMA INTACTO EN PLASMA SEMINAL BOVINO

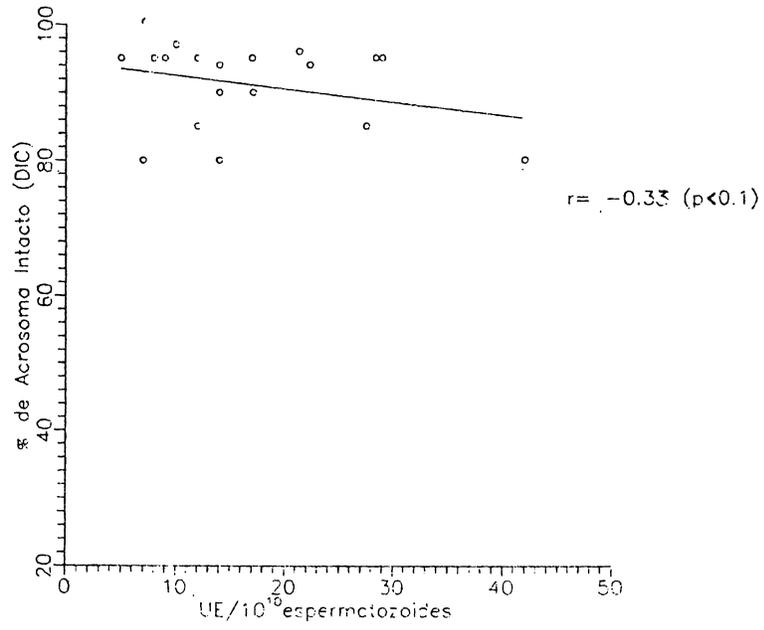


grafico 5