

Protocolo de ensayo cometa a partir de espermatozoides de epidídimos de roedores.

Daniel Francisco Arencibia Arrebola^{1*}, Luis Alfredo Rosario Fernández^{2},**

Yolanda Emilia Suárez Fernández^{3*}, Yamilka Soroa Millán^{4****}.**

¹Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia, Aspirante a Investigador.

²Licenciado en Microbiología, Profesor Instructor.

³Doctor en Medicina Veterinaria, Profesor Titular, Doctor en Ciencias Veterinarias.

⁴Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Centro de Trabajo:

*Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017, Ciudad Habana, Cuba.

**Instituto de Farmacia y Alimento (IFAL, U.H), Calle 222 e/ 25 y 27, La Coronela, Municipio La Lisa, Ciudad de la Habana, Cuba.

***Universidad Agraria de la Habana (UNAH), San José a carretera Tapaste, Municipio San José, Provincia Habana, Cuba.

****Centro de Química Biomolecular (CQB), Avenida 21, esquina a 200, Atabey, Municipio Playa, Ciudad Habana, Cuba.

Correspondencia a: Daniel Francisco Arencibia Arrebola. Teléfono: 057(07)2716911. Email: darencibia@finlay.edu.cu

Resumen

El ensayo cometa ha sido estandarizado en semen de diferentes especies, pero poco se conoce del análisis en espermatozoides que se encuentran en los epidídimos, es de vital importancia este análisis dado por su alta sensibilidad a los procesos oxidativos que incluyen la formación de radicales libres durante el proceso de maduración o metamorfosis. Por lo cual nos proponemos como objetivo fundamental de este trabajo determinar un protocolo de ensayo cometa en espermatozoides de epidídimos de roedores con sus ligeras modificaciones al propuesto por Shen y Ong en el año 2000 en semen. El mismo será de gran utilidad en los ensayos de genotoxicidad y de estrés oxidativo en células germinales masculinas de roedores.

Palabras clave: Ensayo cometa *in vivo*, espermatozoides de epidídimos, procedimiento experimental.

Abstract

Comet assay protocol from rodent epididymal sperm.

The comet assay has been standardized in semen of different species, but little is known of the analysis are sperm in the epididymis, is of vital importance to this analysis given its high sensitivity to oxidative processes involving free radical formation during the process of maturation or metamorphosis. Therefore we propose as a fundamental objective of this work to determine a protocol of comet assay in epididymal sperm of rodents with slight modifications to that proposed by Shen and Ong in 2000 in semen. It will be very useful in genotoxicity and oxidative stress assays in masculine germinal cells of rodents.

Key words: *in vivo* comet assay, epididymal sperm, experimental procedure.

Introducción

El Ensayo de Cometa o electroforesis en gel de células individuales, es un método sensible rápido y relativamente de bajo costo para cuantificar daño en el ADN de células individuales;^{1,2} puede ser realizado bajo condiciones neutras, detectando rupturas de doble cadena del ADN, o bajo condiciones alcalinas, detectando rupturas de simple cadena del ADN y sitios álcali lábiles.

En esta técnica, las células son embebidas en un gel de agarosa en un portaobjetos, sometidas a lisis alcalina o neutra y luego corridas por electroforesis durante un corto tiempo bajo condiciones alcalinas (Ph=13) o neutras (pH=8,4). Las células con mayor daño del ADN muestran una migración aumentada desde el núcleo hacia el ánodo.^{1, 2} Las ventajas de esta técnica incluyen:

(a) Los datos son colectados al nivel de células individuales, proveyendo información de la distribución intercelular del daño y de la reparación.

(b) Se requieren sólo pequeños números de células (unos pocos miles).

(c) Virtualmente cualquier población de células eucariotas puede ser utilizada.

En nuestros días se destacan un sin numero de protocolos de ensayos en este ámbito, pero se observa gran predilección por el ensayo cometa en leucocitos de sangre periférica tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* en sus diferentes variantes tanto neutra como alcalina y el ensayo cometa utilizando células hepáticas en ensayos tanto *in vivo* como *ex vivo*.^{3, 4}

El avance de la utilización de drogas que inhiben el estrés oxidativo o envejecimiento ha traído consigo un aumento del interés y realización de esta técnica, encontrándose ya hasta sistemas computarizados que permiten el análisis del ADN degradado que se dirige hacia el ánodo al realizar la electroforesis.

El ensayo cometa ha sido estandarizado en semen de diferentes especies, pero poco se conoce del análisis en espermatozoides que se encuentran en los epidídimos, es de vital importancia este análisis dado por su alta sensibilidad a los procesos oxidantes que incluyen la formación de radicales libres durante el proceso de maduración o metamorfosis.

Por lo cual nos proponemos como objetivo fundamental de este trabajo determinar un protocolo de ensayo cometa en espermatozoides de epidídimos de roedores con sus ligeras

modificaciones al propuesto por Shen y Ong en el año 2000 en semen.⁵ El mismo será de gran utilidad en los ensayos de genotoxicidad y de estrés oxidativo en células germinales masculinas de roedores.

Desarrollo

Selección de los niveles de dosis, momento del sacrificio, vía de administración y tamaño de los grupos experimentales.

- Los criterios para la selección de las dosis se basan en los valores de la DL₅₀ encontrados.
- El mayor nivel de dosis debe demostrar cierta genotoxicidad del material genético en las células espermatozógenas. A partir de este nivel se deben incluir al menos otros dos inferiores para tratar de demostrar la existencia de un efecto relacionado con las dosis.^{6,7}
- De no haber sido determinada la DL₅₀ ni toxicidad en células germinales, las dosis a utilizar deben tener en cuenta la farmacocinética y/o las dosis farmacológicas de la sustancia ensayo, los resultados de estudios de toxicología subcrónica y crónica y la posible dosis a utilizar en humano.⁶
- Se realizará como esquema fundamental 5 administraciones separadas 24 horas por la vía que resulte común a la que será utilizada en humanos. Puede incluirse además la vía intraperitoneal como aquella que no presenta factores modificadores del compuesto. Otros esquemas pueden incluir la inoculación durante 35 días en ratones e inclusive hasta 8 semanas, para realizar el seguimiento de todo el periodo de espermatogénesis y en ratas hasta 52 días.⁷
- Se utilizarán al menos 4 grupos de tratamiento incluido los controles, con un mínimo de 8 animales por cada grupo.
- Es necesario incluir un grupo control de vehículo por la misma vía y se acepta como control positivo la utilización de sustancias de referencias las cuales pueden ser administradas por una vía diferente, también es posible utilizar los datos históricos del laboratorio.⁸

Obtención de los espermatozoides de epidídimos.

1. Al terminar el tratamiento se sacrifican los animales aleatoriamente por dislocación cervical.
2. Se aplicará alcohol al 70 % en el abdomen, cortar con tijeras de iris la piel que cubre el abdomen y extraer los epidídimos y testículos dejándolos al descubierto.
3. Cortar los testículos y pesar (si el protocolo lo requiere).
4. Cortar los epidídimos, pesar (si el protocolo lo requiere) y colocarlos en placas petri conteniendo 1 mL de solución salina (NaCl 0.9 %). En el caso de ratas solo se procesa un epidídimo pero utilizándose solo la cabeza. Para ratones se procesan los dos.⁹
5. Con ayuda de una tijera de punta fina reducir los epidídimos a pedazos muy pequeños.
6. Añada nuevamente solución salina (2 mL) y trasvase todo a un tubo de ensayo de 10 mL.⁹
7. Homogenice por agitación mecánica manual (golpes suaves sobre las paredes del tubo).
8. Luego se procesaron los espermatozoides por el método de *swim up*, procedimiento de *jumping*, el cual comienza tomándose 200 µl de la muestra de epidídimos anteriormente obtenida y se depositó en el fondo de una copa la cual debe contener con anterioridad 1 ml de medio Sperm-Talp (tiroides, albúmina, lactato, piruvato) previamente incubado por un periodo mínimo de 2 horas el cual es útil en todos los protocolos de manipulación y capacitación de espermatozoides; la muestra debe ser incubada a 37°C, 5% de CO₂ y 99% de humedad relativa/1 h. La parte superior del sobrenadante será recuperada y resuspendida en medio FIV-TALP modificado según el protocolo para espermatozoides porcinos según Johnson y colaboradores en el 1998¹⁰ y Rath y colaboradores en el 1999,¹¹ y llevada a una concentración de 1×10^6 células/ml realizando el conteo en cámara de Neubauer.^{5, 12-14}
9. Luego debe proceder a diluir con el medio anterior cada muestra a analizar hasta obtener una concentración de 5×10^5 espermatozoides/ml que será la utilizada en el ensayo cometa.

Ensayo cometa modificado para espermatozoides de epidídimo según el protocolo propuesto por Shen y Ong en el 2000:⁵

Debe tener en cuenta siempre que al reproducir este protocolo debe hacerlo estandarizando cada parámetro bajo sus condiciones experimentales, teniendo en cuenta la temperatura, la concentración de agarosa en el gel, pH, temperatura, duración y pH en la variante alcalina, voltaje, amperaje y duración de la electroforesis.

- De cada tratamiento se utilizaran 5×10^5 espermatozoides/ml ajustada y suspendidas en agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% (en PBS libre de Ca^{++} y Mg^{++}) en dos láminas portaobjetos pretratadas con 100 μl de agarosa de punto de fusión normal al 0.5% (en PBS libre de Ca^{++} y Mg^{++}).
- Después de realizar una incubación durante 10 min a temperatura ambiente, los portaobjetos son colocados en solución de lisis número 1 (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10% DMSO y 1% de Triton X 100) a un pH= 10.0, a 4 °C/4 h.
- Posteriormente, los portaobjetos son pasados a solución de lisis número 2 (2.5M NaCl, 100 mM Na_2 EDTA, 10 mM Tris, 200 $\mu\text{g/ml}$ de proteinasa K y 300 mM de DTT) a un pH = 7.4, a 37.5 °C/18 h.
- Terminada la lisis número 2, son incubados en tampón de electroforesis (NaOH 0.3 M, EDTA 200 mM) a un pH = 13.0 a 4 °C/10 min, en un cuarto oscuro.
- Luego se realiza una corrida electroforética a 25 V y 100 mA/10 min.
- En el siguiente paso se procede a lavar las láminas portaobjetos con tampón neutralizante (0.4 M Tris-HCL; pH 7.5) y deshidratarlas con metanol puro.
- Una vez secas se procede a la tinción con nitrato de plata (carbonato de sodio + nitrato de plata + nitrato de amonio + ácido tungstosilícico + formaldehído con 37% de pureza).¹⁵
- Sumerja las láminas en la solución de tinción durante 35-40 minutos y protéjalas de la luz.
- Lave los geles cuidadosamente de 10 a 20 segundos, sumergiéndolos en agua bidestilada.¹⁶
- Sumerja las láminas durante 5 minutos en ácido acético al 1% para detener la tinción.

- Lave los geles sumergiéndolos y seguidamente sacándolos en agua destilada. Repita esta operación de 4 a 6 veces en agua.
- Drene los geles durante una hora a temperatura ambiente.¹⁷
- Conserve en condiciones adecuadas para ser observados al microscopio óptico.

Análisis visual de los cometas.¹⁸

Para observar la lámina proceda según el método de sixa. La cuantificación del daño puede realizarse por dos métodos:

- Método 1. Se analizan 50 células por lámina y se les mide la longitud total de ADN migrado desde el comienzo del halo celular hasta los últimos 3 fragmentos de ADN perpendiculares a la dirección de migración con una escala ocular.¹⁹ La variable a procesar es la longitud total de ADN migrado (LT). Al análisis estadístico las pruebas paramétricas más utilizadas son ANOVA y t-student, y de ser necesaria una prueba no paramétrica por no cumplir tales supuestos se usa la U de Mann Whitney.
- Método 2. Se analizan 100 células por lámina y se clasifican por niveles de migración: ninguna, corta, media, larga y muy larga. A estos niveles se les dan valores numéricos (0, 1, 2, 3 y 4).^{20,21}

Además a partir de ellos se analizan las unidades arbitrarias según Collins en el 2004:²¹

$$UA= 0 \times TCG0 + 1 \times TCG1 + 2 \times TCG2 + 3 \times TCG3 + 4 \times TCG4.$$

⁰TCG0= Total de células grado 0 (células no dañadas).

¹TCG1= Total de células grado 1 (mínima frecuencia de lesiones en el ADN).

²TCG2= Total de células grado 2 (daño moderadamente bajo, con frecuencia moderadamente alta de lesiones en el ADN).

³TCG3= Total de células grado 3 (daño moderadamente bajo, con frecuencia moderadamente alta de lesiones en el ADN).

⁴TCG4= Total de células grado 4 (células totalmente dañadas con cometas visibles).

Análisis estadístico general.

Para el procesamiento estadístico se comparan las frecuencias de aparición de células en cada uno de los niveles empleando el test de Chi cuadrado o el análisis de varianza con las correspondientes pruebas de medias (Duncan), se procede a este último de reflejarse los

resultados promedios en cada grupo de tratamiento analizado según el % existente en cada una de estas clasificaciones y de cumplirse con los supuestos para realizar esta prueba. De no haber normalidad y homogeneidad de varianza proceda a comparar los % utilizando la prueba no paramétrica de la U de Mann Whitney.

“Importante aclaración”.

Se puede establecer también una correlación entre los resultados del % del daño mediante este ensayo cometa reflejado como el % de cometas con grado 4, el porcentaje de espermatozoides con cabeza anómala en un total de 500 espermatozoides analizados por animal y el porcentaje de espermatozoides que experimentan gota citoplasmática tanto distal como proximal,²² como resultado del daño genotóxico y de la ocurrencia de estrés oxidativo en las células germinales masculinas por la formación de radicales libres que dañan la integridad de la membrana externa del espermatozoide durante la maduración. Estos dos últimos parámetros los puede obtener mediante la técnica de tinción estandarizada por nosotros de la morfología de la cabeza del espermatozoide de epidídimos.^{9, 22}

En la figura 1 se puede observar el cometa de espermatozoides de epidídimos grado 4 de una rata tratada con 50 mg/kg de ciclofosfamida por vía i.p 48 y 24 horas antes del sacrificio, en la figura 2 se observa la imagen de un cometa grado 4 obtenido de espermatozoide de rata tratada con 40 mg/kg de bleomicina por vía i.p 48 y 24 horas antes del sacrificio, además en la figura 3 y 4 se observan cometas típicos de los animales controles con su patrón normal de migración. Las cuatro imágenes fueron teñidas con nitrato de plata. Estas imágenes constituyen archivos personales de los autores del artículo.

Figura 1. Cometa de espermatozoide de rata tratada con ciclofosfamida.

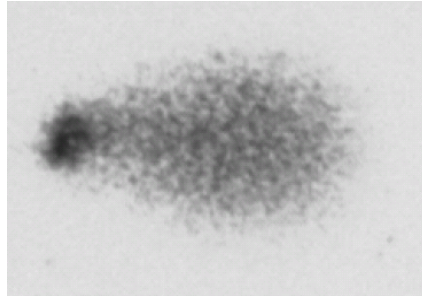
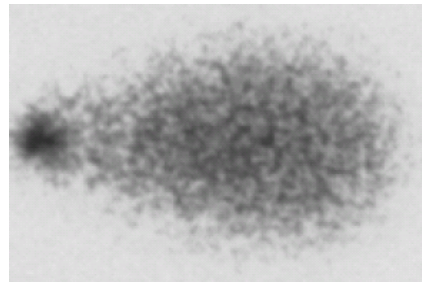
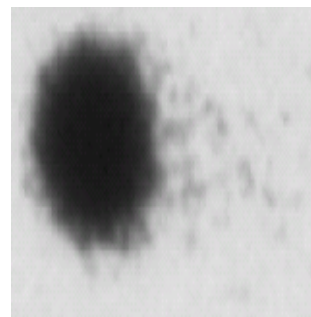
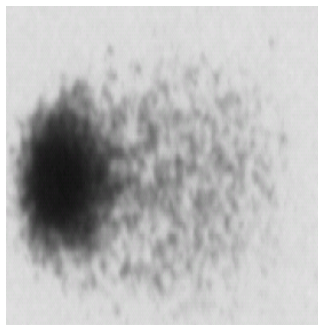


Figura 2. Cometa de espermatozoide de rata tratada con bleomicina.



Figuras 3 y 4, de Izquierda a Derecha. Cometas típicos de los animales
Controles con su patrón normal de migración.



Referencias Bibliográficas

1. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. the comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res* 1995; 339:37-59.
2. Olive PL. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int. J. Radiat. Biol* 1999; 75(4):395-404.
3. Arencibia DF, Rosario LA. Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos *in vitro*. *Retel* 2009; 20(3):24-41.
4. Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D. Estrategias en las evaluaciones genotóxicas. *Retel* 2009; 23(3):23-40.
5. Shen HM, Ong CN. Detection of oxidative ADN damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:529-536.
6. Arencibia DF, Gámez R, Gutiérrez A, Pardo B, Noa M, Mas R, Curveco D, García H, Goicochea E. Evaluación Genotóxica del D-004 en el Ensayo de la Morfología de la Cabeza del Espermatozoide en ratones OF-1. *Rev. CENIC* 2009; 40(1):29-32.
7. Arencibia DF, Gámez R, Gutiérrez A, Pardo B, Curveco D, García H, Goicochea E. Evaluación Genotóxica del D-004, extracto del fruto de *Roystonea regia*, en el Ensayo de la Morfología de la Cabeza del Espermatozoide en ratas *Sprague Dawley*. *Rev Tox* 2009; 26(1):47-50.
8. Wyrobek AJ. An evaluation of the sperm morphology test in experimental animals and other sperm test in humans. *Mut Res* 1983; 115(3):73-148.
9. Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D. Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad. *Retel* 2009; 25(3):22-38.
10. Johnson LA, Welch GR, Rens W, Long CR, Dobrinsky JR. High speed sorting of spermatozoa: procedural adaptations and effects of high system pressure for enhanced sexing of mammalian sperm based on DNA. *Cytometry* 1998;(Suppl 9):131.
11. Rath D, Long CR, Dobrinsky JR, Welch GR, Schreier LL, Johnson LA. In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high speed sorting of X-chromosome bearing sperm to produce piglets after embryo transfer. *J Anim Sci* 1999; 77:3346-52.

12. Johnson LA, Flook JP, Look MV, Pinkel D. Flow sorting of X and Y chromosome-bearing spermatozoa into two populations. *Gamete Res* 1987; 16(1):1-9.
13. Ángel D, Pérez N, Pareja A, Camargo O, Urrego R. Efecto de la preparación espermática previo a la fertilización *in vitro* sobre la membrana plasmática y el ADN de semen bovino sexado. *Rev CES* 2009; 4(2):29-37.
14. Urrego R, Ríos A, Olivera M, Camargo O. Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de espermatozoides bovinos. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2008; 21:19-26.
15. Calderón L, Osnaya N, Ramirez L, Villareal A. DNA strand breaks in human nasal respiratory epithelium are induced upon exposure to urban pollution. *Environ. Hlth. Persp* 1996; 104:160-168.
16. Reinhardt P, McLean JR, Deslauriers Y, Gorman W, Cabat S, Rouabhia M. The use of silverstained "comets" to visualize DNA damage and repair in normal and Xeroderma pigmentosum fibroblasts after exposure to simulated solar radiation. *Photoch and photob* 2000; 71(4):422-425.
17. Tice RR. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells, in: D.H. Phillips, S. Venitt (Eds.), *Environmental Mutagenesis*, Bios Scientific Publishers LTD, Oxford, UK; 1995.p.315-339.
18. Arencibia DF, Rosario LA. Algunas consideraciones sobre el desarrollo de la técnica para el ensayo cometa *in vivo* en leucocitos de sangre periférica y células del hígado. *Retel* 2010; 26(1):1-12.
19. Hartmann A, Schumacher M, Plappert-Helbig U, Lowe P, Suter W, Mueller L. Use of the alkaline *in vivo* comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagen* 2004; 19:51-59.
20. Meintieres S, Nesslany F, Pallardy M, Marzin D. Detection of ghost cells in the standard alkaline comet assay is not a good measure the apoptosis. *Envir. Mol. Mut* 2003, 41:260-269.
21. Collins AR. The Comet Assay for ADN Damage and Repair. *Principles. Mol. Biotech* 2004; 26:249-261.

22. Arencibia DF, Rosario LA. Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratas Sprague Dawley. RevistaCiencias.com 2010; 2:1-5.

Recibido: 07/05/10

Aceptado: 08/05/10