

SEPARACIÓN DE CELULAS ESPERMÁTICAS CON NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

C. Camaño¹, J. Molinari¹, G. Ybarra¹, C. Moina¹, V. Farini², D. Viale², M. Radrizzani²
(1) INTI Procesos Superficiales, (2) Laboratorio de Neuro y Citogenética, EcyT, UNSAM
gabriel@inti.gob.ar

OBJETIVO

Separar magnéticamente células espermáticas bovinas apoptóticas (en proceso de muerte celular autoinducido) de células viables, utilizando biomarcadores de membrana mediante el desarrollo de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con aptámeros.

DESCRIPCIÓN

Las muestras seminales utilizadas para la fertilización del ganado bovino se conservan mediante criopreservación. Este proceso y el descongelamiento provocan la apoptosis celular y la pérdida de viabilidad de los espermatozoides. Una de las primeras manifestaciones de este evento es la presencia de moléculas en la cara externa de la membrana plasmática que en células viables no se encuentran. Estas moléculas se utilizan como biomarcadores de apoptosis. El presente trabajo emplea nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas (SPION) recubiertas con óxido de silicio sobre las cuales se une covalentemente avidina y aptámeros contra el biomarcador unidos a biotina que reconocen esta molécula en la membrana de los espermatozoides. Los aptámeros son, generalmente, secuencias oligonucleotídicas (DNA o RNA) obtenidas *in vitro* que consisten en una secuencia lineal de nucleótidos. En solución tienen la capacidad de unirse específicamente y con gran afinidad a una gran variedad de moléculas blanco ("target"). La especificidad de unión avidina-biotina y las propiedades magnéticas de las nanopartículas permiten la separación de estos espermatozoides no viables con la aplicación de un campo magnético externo.

Obtención de SPION recubiertas con óxido de silicio: La obtención de partículas de Fe_3O_4 (magnetita) se realizó mediante una coprecipitación de sales $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en una relación 2:1. Las partículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemita) se sintetizaron a partir de la magnetita por oxidación con HNO_3 0.1 N (Anedra) a reflujo. Luego se separó la solución resultante y se lavó 2 veces con agua purificada.

Las partículas obtenidas se recubrieron con óxido de silicio por el Método Stöber utilizando una relación alcohol isopropílico (Biopack): Tetraetilortosilicato (TEOS) (Sigma-Aldrich): NH_4OH 25% (Biopack) : agua purificada (25:

0,5: 0,75: 1,0). Las NP se lavaron y resuspendieron en agua purificada. Se tomó una alícuota de nanopartículas (NP) obtenidas y se secó en estufa a 130°C hasta obtener un polvo. Se montó sobre una cinta de Carbono y se observó en el Microscopio electrónico de barrido (SEM) (Carl Zeiss Supra 40) del Laboratorio de Microscopía Avanzada de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (Ver Fig. 1).

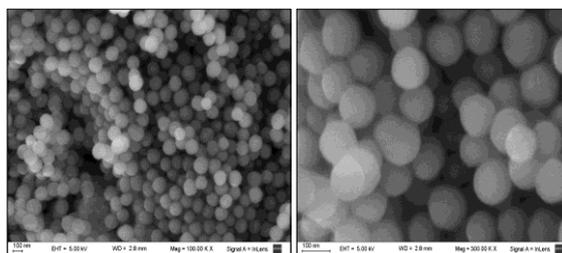


Figura 1: NP de $\text{SiO}_2@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ observadas en SEM del Centro de Microscopía de la FCEyN-UBA a 100.000 y 300.000 aumentos respectivamente.

Funcionalización de nanopartículas con grupos carboxilos: la reacción se llevo a cabo en relación 1:1 NP: 3-aminopropil-trimetoxisilano 97% (APTES) (Sigma-Aldrich). El pellet obtenido se hizo reaccionar 12 hs en relación 1:1 con N,N-dimetilformamida 0.1 M (Merck), anhídrido succínico 1M en DMF y piridina (Merck). Las NP funcionalizadas con grupos carboxilos se lavaron en N,N-dimetilformamida, HCl 5% y agua purificada.

Inmovilización de avidina: La reacción se llevó a cabo en una relación 1,5 mg NP: 800 μl clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida (EDC) 0.1 M (Sigma-Aldrich) en buffer fosfato 0.1 M pH 7.0: 80 μl de N-hidroxisuccinimida 98%(NHS) 25 mM en buffer fosfato 0.1M pH 7.0.

Se dejó reaccionar por 30 minutos con agitación. Se lavó con buffer borato 0.1M pH 8.5. Al pellet se agrego un volumen de solución de avidina 1 mg/ml en buffer borato pH 8,5 para obtener una relación NP: avidina (1,5 mg: 0,063 mg). Se incubó a 4°C por 12 horas.

Obtención de aptámeros biotinizados: Fueron provistos por el Laboratorio de Neuro y Citogenética de la Escuela de Ciencia y Técnica de la Universidad de San Martín.

Determinación de la capacidad de unión de las NP con avidina inmovilizada (NP-avidina): se incubaron volúmenes (μl)

crecientes de NP-avidina con 5 μM en buffer fosfato salino de aptámeros biotinizados y sin biotinizar como control negativo. Se midió la absorbancia a $\lambda_{260\text{ nm}}$ del sobrenadante obtenido al separar magnéticamente el volumen de reacción. Se calculó la pendiente de la recta Concentración (ng/ μl) DNA=fn Volumen (μl NP-avidina).

Separación magnética de espermatozoides apoptóticos utilizando las NP-avidina obtenidas en pajuelas de semen de toros criopreservadas:

700 μl de NP-avidina lavadas con buffer fosfato salino se resuspendieron en 500 μl del mismo buffer con seroalbumina bovina 2 mg/ml. Se incubaron 150 μl de una solución de 100 μM de aptámeros biotinizados previamente desnaturalizados a 95°C con el semen contenido en las pajuelas criopreservadas (500 μl) diluido 1:5 en buffer fosfato salino con seroalbumina bovina 2 mg/ml y 300 μl de colorante vital Hoescht 5 $\mu\text{g/ml}$ a 37°C por 15 minutos. Se agregaron los 500 μl de NP-avidina y se incubaron a 37°C por 15 minutos. Todo el volumen de reacción se separó magnéticamente. El sobrenadante se observó entre cobre y portaobjeto al microscopio invertido de epifluorescencia Olympus IX-71 Filtro U-MWU (BP 330-385). Cámara DP72. Software DP2-BSW 100 x. (Ver Fig.2). Se determinó el porcentaje de espermatozoides viables y no viables en las muestras tratadas y en una alícuota del semen diluido sin tratar.

Liofilización de las nanopartículas con avidina inmovilizada obtenidas (NP-avidina):

700 μl de las NP-avidina obtenidas se lavaron con buffer fosfato salino y se resuspendieron en el mismo buffer con seroalbumina bovina 2 mg/ml. Esta suspensión se liofilizó en el liofilizador marca Rificor Modelo L-I-E del Centro INTI Cereales y Oleaginosas. El liofilizado se reconstituyó con 500 μl de H₂O purificada.

RESULTADOS

Se logró establecer que la capacidad de unión de aptámeros es de 2,67 ng/ μl por cada μl de NP-avidina. Se determinó la relación óptima NP: avidina en la técnica de inmovilización de avidina que es de 1,5 mg: 0,063 mg respectivamente. Según los ensayos realizados con las NP-avidina obtenidas se estableció que la relación óptima de volúmenes de NP-avidina:aptámeros:semen es de 1,4:0,3:1,0. Se utilizaron NP-avidina sin liofilizar y liofilizadas para determinar la capacidad de captura de espermatozoides apoptóticos en pajuelas de semen de toros criopreservadas.

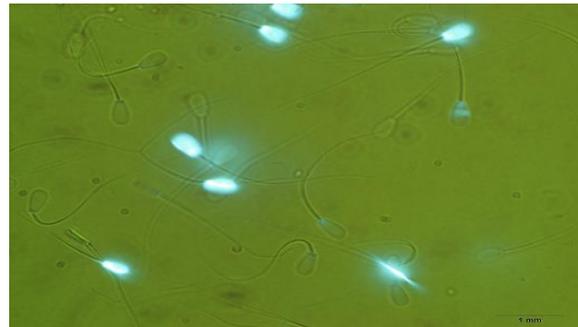


Figura 2: Foto tomada con Microscopio Invertido de Epifluorescencia. Los espermatozoides apoptóticos se ven coloreados y los viables transparentes.

Las pajuelas utilizadas poseían alrededor de 50% de espermatozoides apoptóticos.

Se compararon los resultados entre pajuelas de semen criopreservado tratadas con las NP-avidina obtenidas liofilizadas y sin liofilizar. (Ver Gráfico 1). Para ambas condiciones se logró aumentar la cantidad de espermatozoides viables por encima del 60%.

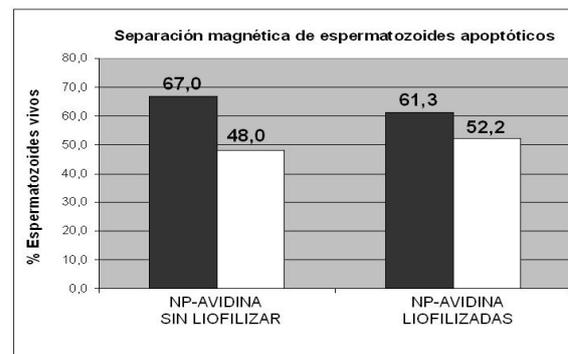


Gráfico 1: Separación magnética de espermatozoides apoptóticos en pajuelas de toro criopreservadas. Las barras blancas corresponden al porcentaje de espermatozoides vivos en las muestras sin tratar y las barras negras al porcentaje de espermatozoides vivos en las muestras tratadas.

CONCLUSIONES

Este método brinda la posibilidad de mejorar la actual tasa de fertilidad por inseminación artificial lograda por los productores ganaderos utilizando pajuelas criopreservadas. Los resultados obtenidos permitieron aumentar el porcentaje de espermatozoides viables hasta valores mayores al 60% que las convierten en pajuelas más eficientes para éste método de fertilización. Estos valores resultaron ser superiores a los obtenidos con esferas comerciales (Streptavidin Magnesphere®) y similares a los obtenidos con las NP-avidina liofilizadas. Las NP-avidina liofilizadas ofrecen la ventaja de no requerir refrigeración para su conservación y un menor costo de producción.