PERDIDA DE VIABILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES DE VERRACO A LO LARGO DEL PROCESO DE CRIOCONSERVACION

Blanch, E., Mocé, E.
IVIA- Centro de Tecnología Animal (Segorbe-Castellón). e-mail: emoce@ivia.es

INTRODUCCIÓN

Un alto porcentaje de espermatozoides resultan dañados irreversiblemente al ser sometidos a los protocolos de crioconservación actuales. Además, un elevado número de los espermatozoides que sobreviven presentan daños subletales, lo que obliga a aumentar el número de espermatozoides en las dosis de inseminación, a realizar inseminaciones intrauterinas y a acercar el momento de la inseminación al de la ovulación (Holt, 2000). Una de las estructuras más dañadas durante el proceso de crioconservación es la membrana plasmática, debido tanto al descenso de temperatura (que provoca cambios en la organización de los lípidos de la membrana) así como al estrés osmótico al que son sometidas durante el proceso. Los espermatozoides de verraco son extremadamente sensibles al descenso de la temperatura, por el bajo ratio colesterol:fosfolípidos que presenta su membrana (Holt, 2000). En otras especies con bajo ratio colesterol:fosfolípidos (toros, moruecos y caballos), se ha observado que la supervivencia de los espermatozoides al proceso de crioconservación mejora cuando son tratados con ciclodextrinas saturadas de colesterol (Combes *et al.,* 2000; Purdy y Graham, 2004; Morrier *et al.,* 2004).

El objetivo de este trabajo fue determinar en qué puntos del protocolo de congelación las membranas de los espermatozoides de verraco sufren un daño mayor, mediante análisis de viabilidad de los espermatozoides tras incubación (39ºC, 3 horas) de las muestras de semen que habían completado diferentes fases del protocolo. También se determinó si el tratamiento de los espermatozoides con ciclodextrina saturada de colesterol (CLC) previamente a la crioconservación mejoró la viabilidad de las muestras.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 10 eyaculados procedentes de seis verracos de raza Pietrain. La recolección se realizó mediante masaje manual. El protocolo general utilizado para la congelación fue el descrito por Gadea *et al.* (2005). El semen fue diluido 1:1 con Beltsville Thawing Solution (BTS, Johnson et al., 2000) y transportado a temperatura ambiente (22ºC) durante tres horas. La ciclodextrina saturada de colesterol (2-hidroxipropil-β-ciclodextrina) se preparó según el protocolo descrito por Purdy y Graham (2004). Se utilizaron tres alícuotas de semen: control (C), control negativo (CN; tratado con 2 mg metil-β-ciclodextrina/120 x 10^6 espermatozoides 15 minutos antes del comienzo de la fase de incubación a 16ºC) y tratados con CLC (CLC; 2 mg CLC/120 x 10^6 espermatozoides 15 min antes de la fase de incubación a 16ºC). Las muestras fueron enfriadas lentamente hasta 16ºC durante 2 horas, centrifugadas posteriormente a 800 g durante 10 minutos a 16ºC y resuspendidas con diluyente lactosa-yema de huevo (Westendorf *et al.,* 1975). En este punto un conjunto de muestras fue separado y se mantuvo a 16ºC para su evaluación a las 24 h de conservación.

A continuación los espermatozoides (200 x 10^6 espermatozoides/mL) fueron enfriados lentamente hasta 5ºC durante 2h, tras lo cual se añadió diluyente lactosa-yema de huevo con 1,5% Orvus Es Paste y 9% glicerol (concentración final de 150x10^6 espermatozoides/mL y 3% de glicerol). Después de esta fase otro conjunto de muestras dejó de ser procesado y se conservó a 5ºC durante 24 h para su evaluación posterior.

El resto de las muestras fueron envasadas en pajuelas de 0,5 mL y congeladas a 4 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido durante 20 min. La descongelación se realizó en baño de agua a 39ºC, 30 seg. La viabilidad se evaluó por citometría de flujo, según el protocolo descrito por Purdy y Graham (2004). Los espermatozoides fueron teñidos con SYBR 14 y yoduro de propidio (PI) y se analizaron en un citómetro Coulter EPICS XL-MCL (Beckman Coulter Inc., Miami, FL) con un láser de argón a 488 nm. Se recogieron datos de fluorescencia de 10.000 eventos. La fluorescencia del SYBR 14 fue recogida en el sensor FL1 usando un filtro de paso de banda de 525 nm y la fluorescencia del PI se recogió en el sensor FL3 con un filtro de paso de banda de 620 nm. Las observaciones se realizaron a 0, 1 y 3 horas tras incubación de las muestras en baño de agua a 39ºC.

El porcentaje de espermatozoides vivos se analizó mediante un procedimiento GLM (SAS) para observar si existían diferencias entre los tres tipos de tratamiento, entre las tres fases del protocolo de congelación y entre los tres momentos de la incubación a 39ºC.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El colesterol juega un papel muy importante en la regulación de la estructura y la funcionalidad de la membrana plasmática por su efecto en el comportamiento de cambio de fase de los fosfolípidos a través de su interacción con éstos (Holt, 2000). Así, la susceptibilidad al "cold-shock" es mayor en aquellas especies cuyos espermatozoides presentan un ratio colesterol-fosfolípidos bajo (Holt, 2000), como en el caso de la especie porcina. La adición de colesterol mejora la supervivencia de los espermatozoides de especies con bajo contenido en colesterol. No obstante, no se observaron diferencias entre los tratamientos (C, CN y CLC) en ninguna fase del protocolo durante la incubación a 39ºC. Estos resultados son inesperados ya que, *a priori* y tal y como se observa en otras especies (Purdy y Graham, 2004; entre otros), los espermatozoides de verraco deberían beneficiarse del tratamiento con los CLC por su bajo ratio colesterol:fosfolípidos. En los escasos trabajos realizados con espermatozoides de verraco en los que se han utilizado ciclodextrinas los resultados parecen contradictorios (Zeng y Terada, 2000;2001; Galantino-Homer *et al.,* 2006). Quizás esta falta de respuesta sea debida a que el protocolo para la adición de estas sustancias fue similar al seguido en otras especies, y sea necesario modificar éste (adición en otras fases del protocolo, testar diferentes ciclodextrinas o variar las concentraciones de CLC) para observar mejoras tras la descongelación.

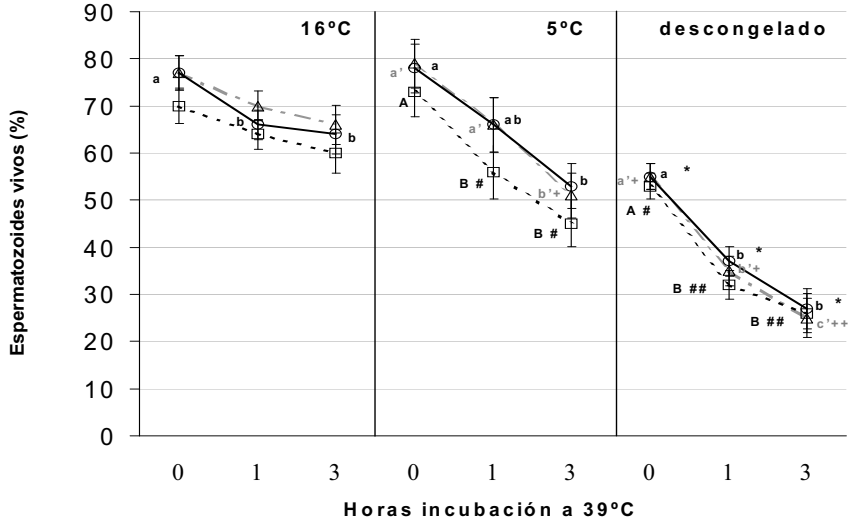


Figura 1. Porcentajes de espermatozoides vivos de verraco (y error estándar conjunto asociado) en muestras que han completado varias fases del protocolo de crioconservación [descenso de temperatura a 16ºC (n = 8), a 5ºC (n = 8) ó bien criopreservados (n = 10)], tras realizar varios tratamientos sobre los espermatozoides frescos [control (—△—), tratados con ciclodextrinas-control negativo (—○—), o tratados con ciclodextrina saturada de colesterol-CLC (- -□- -)], y ser incubados a 39ºC durante tres horas.

(a', b', c'), (a, b) y (A, B) indican que, dentro de cada fase del protocolo de crioconservación, existen diferencias ($P < 0,05$) entre las horas de incubación a 39ºC para los espermatozoides control, los control negativo o los tratados con CLC, respectivamente.

Los símbolos (+, ++), (*) y (#, ##:) indican que, dentro de cada hora de incubación a 39ºC, existen diferencias ($P < 0,05$) entre fases del protocolo de crioconservación (16ºC, 5ºC y crioconservación) para los espermatozoides control, control negativo o tratados con CLC, respectivamente.

En las muestras que completaron la fase de descenso de temperatura a 16ºC, la viabilidad se mantiene a lo largo del período de incubación a 39ºC, excepto en las muestras CN que sufren una caída significativa en el porcentaje de espermatozoides vivos en la primera hora (77 vs 66%; $P < 0,05$). Tras la fase de incubación a 5ºC se mantiene la viabilidad en las muestras C y CN durante la primera hora de incubación 39ºC, pero se observa una disminución significativa (entre 25 y 28% de pérdida de viabilidad) cuando la incubación llega a las 3 horas. No obstante, para las muestras CLC esta pérdida de viabilidad es significativa tras la primera hora de incubación a 39ºC (73 vs 56%; $P < 0,05$). En las muestras crioconservadas, esta disminución de viabilidad es ya significativa tras la primera hora de incubación en todos los tratamientos (entre 18 y 20% de pérdida de viabilidad), y en las muestras control el porcentaje de espermatozoides vivos desciende también significativamente en la hora 3.

Lógicamente, en todos los tratamientos se observa un menor porcentaje de espermatozoides vivos al inicio de la incubación (0 h) y tras 1 h de incubación a 39ºC en las muestras crioconservadas que en las que han completado las fases de incubación a 16ºC o a 5ºC. Estos resultados corroboran los observados por Cremades *et al.* (2005) al comparar el porcentaje de espermatozoides móviles y vivos en los distintos pasos del protocolo de congelación de espermatozoides de porcino. Además, las muestras tratadas con CLC presentan también diferencias entre las fases de incubación a 16ºC y a 5ºC tras 1 h de incubación a 39ºC. Tras tres horas de incubación a 39ºC todos los tratamientos (excepto el CN) presentan un porcentaje de espermatozoides vivos significativamente menor en las muestras crioconservadas y en las conservadas a 5ºC. Esta disminución de viabilidad que se observa tras la fase de 5ºC y tras la crioconservación es posiblemente debida a los daños osmóticos que provocan la adición y eliminación de los crioprotectores (Guthrie *et al.,* 2002), así como a los cambios de transición de fase líquida a gel dependientes de la temperatura que inducen cambios en la organización lipídica de la membrana (Holt, 2000). Además, las muestras crioconservadas presentan todavía menor viabilidad debido a la exposición de los espermatozoides a choques osmóticos que resultan de la exposición de los mismos a condiciones anisosmóticas como consecuencia de la congelación del agua extracelular y por daños mecánicos debidos a la formación de hielo intra y extracelular.

En conclusión, es recomendable realizar varias mediciones (nada más descongelar y tras incubación) para detectar adecuadamente el daño sufrido por los espermatozoides al someterlos a procesos que pueden afectar a su estructura y funcionalidad. La adición de CLC según este protocolo no mejoró el porcentaje de espermatozoides de verraco que sobreviven a la crioconservación, siendo necesario continuar con estudios para desarrollar el protocolo adecuado para su adición en esta especie.

Agradecimientos: financiado por el proyecto AGL 2006-07769 y fondos FEDER. Agradecemos a la explotación 'Los Golliznos' la donación de las muestras.

REFERENCIAS BIBILIOGRÁFICAS

Combes GB, Varner DD, Schroeder F, Burghardt RC, Blanchard TL. J Reprod Fertil 2000; Suppl 56:127-132.

Cremades T, Roca J, Rodríguez-Martínez H, Abaigar T, Vázquez JM, Martínez EA. J Androl., 2005;26:610-618.

Gadea J, Gumbao D, Matas C, Romar R. J Androl 2005;26:749-756.

Galantino-Homer HL, Zeng WX, Megee SO, Dallmeyer M, Voelk D, Dobrinski I. Mol Reprod Dev. 2006;73:638-650.

Guthrie HD, Liu J, Critser JK. Biol Reprod 2002;67:1811-1816.

Holt WV. Theriogenology. 2000;53:47-58.

Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. Anim Reprod Sci 2000;62:143-172

Morrier A, Thériault M, Castonguay F, Bailey JL. Proceedings of the Society for the Study of Reproduction Meeting 2004. Vancouver, Canada. P 239 Abstr. 636.

Purdy PH, Graham JK. Cryobiology 2004; 48:36-45.

Westendorf P, Richter L, Treu H. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 1975;82:261-267.

Zeng WX, Terada T. Reprod Fertil Dev 2000; 12:223-228.

Zeng WX, Terada T. J Androl 2001;22:111-118.