EFECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y ACROSOMAL DE ESPERMATOZOIDES DE TOROS

Rubio-Guillén, J., Quintero-Moreno, A., Osorio-Meléndez, C., González-Villalobos, D.
Laboratorio de Andrología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zulia (LUZ), Venezuela.
E-mail: jorgeluis.rubio@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Las membranas espermáticas son unas estructuras heterogéneas que participan en el reconocimiento y transporte de moléculas, con funciones que permiten que el espermatozoide adapte su metabolismo al medio circundante, proporcionándole, un sistema molecular para el reconocimiento del oocito. De aquí deriva que la evaluación estructural del espermatozoide hace énfasis en la valoración de la integridad de su membrana plasmática (MP) y acrosomal (MA); pudiendo en algunas casos evaluarlas juntas o por separado realizando tinciones sencillas. Esta integridad es fundamental para el metabolismo espermático e imprescindible para la fecundación (Bollwein et al., 2008).

La criopreservación seminal afecta directamente la MP y MA, produciendo efectos que menoscaban la motilidad y viabilidad espermática postdescongelación (Rubio, 2006). La integridad estructural y funcional de la MP y MA puede ser determinada usando pruebas que valoran el estado morfológico y la funcionalidad de las mismas, luego de someterse al proceso criogénico o cuando son expuestas a soluciones hiposmóticas (Rota et al., 2000). El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la criopreservación sobre la integridad estructural y funcional de la MP y MA de espermatozoides bovinos, valorando para tal fin la vitalidad (VIT), los acrosomas dañados (DAR), y la respuesta a los tests de endósmosis (HOST) y de resistencia osmótica (ORT).

MATERIAL Y MÉTODOS

El ensayo se realizó en un Centro de Inseminación Artificial, ubicado en Zulia, Venezuela. Se analizaron los eyaculados de 4 toros (5 muestras de semen fresco y 5 criopreservadas).

Para la valoración de la integridad estructural de la MP y MA se utilizó la tinción eosina-nigrosina. Se tomaron 10µL de semen fresco y descongelado; sobre una platina (Osaka, OK 51, España) a 37ºC se mezclaron con 10µL del colorante, realizando un frotis donde se evaluó la VIT y DAR. Para la valoración de la funcionalidad de la MP y MA se utilizaron los test HOST y ORT. En ambas pruebas se incubó el semen durante 30 minutos en un medio de citrato de sodio a 150 mOsm/ L en un Baño María (YCW-035, Taiwán) a 37ºC, después se centrifugaron a 0,3 RCF por 2,5 min. De la centrifugación se tomaron los espermatozoides, se resuspendieron con una parte del sobrenadante y se tomaron 10 µL para realizar la tinción de eosina-nigrosina, luego en un microscopio óptico utilizando el objetivo de 100X se contabilizaron 200 espermatozoides por muestra. En el primer caso (HOST), se observaron las reacciones positivas al test, las cuales fueron medidas al verificar los flagelos de los espermatozoides enrollados parcial o totalmente. Para el segundo caso (ORT), las muestras fueron divididas en dos alícuotas e incubadas en dos medios, uno hiposmótico (150 mOsm/L) y otro isosmótico (300 mOsm/L) y se cuantificaron las reacciones acrosómicas en cada uno de los dos medios. El resultado final se expresaba en porcentaje, luego de aplicar una formula y obtener un cociente (ORT= DAR medio hiposmótico + DAR medio isosmótico/ 2). Las variables evaluadas (VIT, DAR, HOST, ORT) se analizaron utilizando el Proc GLM del SAS (se indican las LSMEANS).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La integridad estructural de MP y MA se vio notablemente afectada por la criopreservación al comparar las muestras frescas y descongeladas de cada toro (Tabla 1). Se mostró en estas estructuras la acción deletérea del proceso criogénico, evidenciando un deterioro de la viabilidad de las muestras; empero, los resultados de estos dos parámetros de evaluación seminal no siempre están correlacionados con la fertilidad (Rubio, 2006), a menos que el daño que presenten los espermatozoides sea muy importante (Rodríguez-Martínez, 2003).

Las variables de integridad estructural de la MP y MA en las muestras de semen fresco, no mostraron diferencias entre toros. Sin embargo, las muestras descongeladas evidenciaron distintos patrones de resistencia a la criopreservación, lo que corrobora información aportada por otros (Januskauskas et al., 2003; Bollwein et al., 2008). Se demostró que las muestras resisten de manera distinta la congelación seminal, de allí que muchas veces se puede encontrar toros con excelentes parámetros de calidad seminal en los eyaculados frescos y que sean catalogados posteriormente como malos congeladores (Madrid-Bury, 2004, Rubio, 2006). Por ejemplo, el toro C mantuvo una excelente integridad de MP y MA y mostró el mejor desempeño al realizar las pruebas antes y después de la criopreservación ($P>0,05$), aunque evidenciando solo diferencias estadísticas a su favor, al evaluar el DAR en las muestras criopreservadas y compararlas con el toro A. Resultado lógico, ya que el ejemplar (A) fue el de peor respuesta. Este parámetro de calidad seminal resulta determinante para una fertilidad óptima en toros (Villanova y Gatica, 2002). La integridad de la MP, MA y la motilidad individual postcongelación reflejan la viabilidad espermática y la criopreservación tiene un efecto directo sobre estas variables, afectando las membranas celulares ocasionando daños como hinchamiento y disrupción, alteración del flujo de calcio, cambios en la fluidez y en la actividad enzimática que inducen una capacitación espermática anticipada y/o reacción acrosómica, afectando la fertilidad (Tartaglione y Ritta, 2004).

Las pruebas que evalúan la funcionalidad espermática de los toros se muestran en la Tabla 2. Se pudo evidenciar como la funcionalidad de la MA de los espermatozoides de cada toro se afectó notablemente debido a la criopreservación. Sin embargo, en semen fresco, no se evidenció diferencias estadísticas entre toros, al realizar el ORT. Empero, el toro C presentó un porcentaje de resistencia acrosomal de 91,90 y 66%, que estuvo por encima de los demás toros evaluados en los eyaculados frescos ($P>0,05$) y en los criopreservados, respectivamente ($P<0,05$). Lo que llevaría a hipotetizar que presentará una fertilidad óptima, debido a que el ORT ha sido correlacionado con la fertilidad (Rubio, 2006). Se ha referido que la congelación seminal puede afectar tanto la integridad estructural (Rota et al., 2006), como la función de las enzimas del acrosoma (Rodríguez-Martínez, 2003). La relación entre la funcionalidad acrosomal y la fertilidad parece ser suficientemente estrecha para sugerirla como prueba de predicción de fertilidad en toros (Prathalingam et al., 2005) o en su defecto, para complementar los parámetros rutinarios de valoración seminal. Los toros B y D luego de la criopreservación tuvieron un incremento en el porcentaje de DAR por encima del 40% ($P>0,05$), lo que hace pensar que estos dos toros perdieron viabilidad al ser sometidos a este proceso. La determinación de la presencia del acrosoma en semen descongelado se considera como un buen indicador de calidad seminal óptima (Villanova y Gatica, 2002).

En otro orden de ideas, se ha descrito que el daño criogénico sobre la cabeza y el flagelo espermático pueden ocurrir independientemente, y la presencia de la membrana flagelar intacta, no indica necesariamente MA integra (Zhu y Liu, 2000). Razón por la cual en este ensayo, se realizaron dos pruebas de evaluación de funcionalidad en dos partes distintas (MP y MA), para mejorar la fiabilidad y predictividad de los resultados, como lo sugieren otros autores (Zhu y Liu, 2000). Para el caso del HOST, no se evidenciaron diferencias entre toros, en las muestras frescas y criopreservadas. Sin embargo, los resultados contribuyeron a complementar las pruebas de valoración de la integridad morfológica de la MP y MA, debido a que el toro A también mostró con el HOST una propensión numérica desfavorable, al evidenciar el peor desempeño en las muestras frescas y criopreservadas ($P>0,05$). Este toro junto con el D, al realizar las pruebas de integridad estructural y funcional mostraron pobres desempeños, al compararlos con sus coetáneos; sin embargo, fueron los menos afectados en lo que respecta al efecto de la criopreservación sobre funcionalidad de la MP (menor al 15% ambos), esto pudiera deberse a que fueron mayormente afectados en la MA y que su MP no fue marcadamente afectada por el procesado. También pudiera ser que la presión de 150 mOsm/L usada en el test no fue lo suficientemente baja para inducir que los espermatozoides reaccionaran adecuadamente, debido a que, algunos investigadores han sugerido para el semen bovino, una presión osmótica de 100 mOsm/L (Rota et al., 2000).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Bollwein, H.; Fuchs, I.; Koess, C. 2008. *Reprod Dom Anim*. 43 (2): 189-195.
Januskauskas, A.; Johannisson, A.; Rodríguez-Martínez, H. 2003. *Theriogenol*. 60: 743– 58.
Madrid-Bury, N. 2004. Postgrado de Facultad de Veterinaria UCM. *Tesis Doctoral*. 1-164 pp.
Prathalingam, N., Holt, W., Revell, S., Watson, P. 2005. *Anim Reprod Sci*: 91 (1-2): 11-22.
Rodríguez-Martínez, H. 2003. *Reprod Dom Anim.* 38: 312–318.
Rota, A.; Penzo, N; Vicenti, L.; Mantovani, R. 2000. *Theriogenol.* 53: 1415-1420.
Rubio, J. 2006. Facultad de Agronomía-LUZ. *Tesis de Maestría.* 1-103 pp.
Tartaglione, C.M.; Ritta, M.N. 2004. *Theriogenol.* 62: 1245-1252.
Villanova, L.; Gatica, R. 2002. *Rev. Científica FCV-LUZ.* XII (3): 202-208.
Zhu, W.; Liu, X. 2000. *Asian J Androl*. 2: 135-138.

Tabla 1. *Parámetros de integridad estructural de la membrana plasmática y acrosomal.*

Parámetro	Tratamiento	Toros			
		A	B	C	D
VIT (%)	Fresco	$92,50 \pm 2,81^{a}$	$92,50 \pm 2,81^{a}$	$95,16 \pm 2,81^{a}$	$91,66 \pm 2,81^{a}$
	Descongelado	$48,40 \pm 3,08^{b}$	$81,40 \pm 3,08^{a}$	$81,40 \pm 3,08^{a}$	$80,00 \pm 3,08^{a}$
DAR (%)	Fresco	$12,50 \pm 3,01^{a}$	$9,83 \pm 3,01^{a}$	$8,50 \pm 3,01^{a}$	$9,16 \pm 3,01^{a}$
	Descongelado	$49,60 \pm 3,29^{a}$	$31,40 \pm 3,29^{b}$	$28,40 \pm 3,29^{bc}$	$31,60 \pm 3,29^{b}$

(a, b): letras diferentes en las filas denotan diferencias estadísticas significativas (P<0,05). VIT (%): porcentaje de espermatozoides vivos (negativos a la tinción eosina). DAR (%): porcentaje de acrosomas reaccionados o perdidos.

Tabla 2. *Parámetros de integridad funcional de la membrana plasmática y acrosomal.*

Parámetro	Tratamiento	Toros			
		A	B	C	D
ORT (%)	Fresco	$86,40 \pm 2,74^{a}$	$90,30 \pm 2,74^{a}$	$91,90 \pm 2,74^{a}$	$86,91 \pm 2,74^{a}$
	Descongelado	$52,40 \pm 2,74^{b}$	$50,00 \pm 2,74^{b}$	$66,00 \pm 2,74^{a}$	$44,00 \pm 2,74^{b}$
HOST (%)	Fresco	$55,90 \pm 6,62^{a}$	$86,00 \pm 6,62^{a}$	$80,90 \pm 6,62^{a}$	$64,60 \pm 6,62^{a}$
	Descongelado	$43,10 \pm 6,62^{a}$	$54,20 \pm 6,62^{a}$	$56,20 \pm 6,62^{a}$	$49,80 \pm 6,62^{a}$

(a, b): letras diferentes en las filas denotan diferencias estadísticas significativas (P<0,05). ORT (%): espermatozoides reaccionados al test de resistencia osmótica. HOST (%): espermatozoides positivos al test de endósmosis.

Agradecimientos: Trabajo financiado por el CONDES-LUZ (Proyecto CC-0162-08).

EFFECT OF CRYOPRESERVATION ON INTEGRITY OF PLASMATIC AND ACROSOMAL MEMBRANE OF BULLS SPERM

ABSTRACT: Plasmatic and acrosomal membrane integrity has been used as valuable information for determining sperm quality, because is important to know the morphological and functional role as cellular delimitation and in effective cell interactions. The aim of this study was to determine cryopreservation effects on vitality (VIT), number of damaged acrosomes (DAR) and functional sperm plasma membrane integrity of bulls. The functional integrity of membrane was evaluated by osmotic tests (HOST and ORT). In all cases, there were used 5 fresh ejaculates and 5 thawed straws. The data was analysed by GLM procedure, and when differences were detected, LSMEANS was used to quantify the effects. Significant differences were found on seminal quality parameters (VIT, DAR, ORT and HOST) between fresh and thawed sperm. Freezing-thawing procedure had detrimental effect on the integrity structural and functional of MP and MA in the spermatozoa evaluated (P<0.05). However, it was possible to demonstrate that the spermatozoa have different pattern of resistance to the detrimental effects of cryopreservation. Then, this study confirms that cryodamage could happen indistinctly on the structural and functional MP and MA integrity, which would affect the fertilizing capacity of seminal samples destined for Artificial Insemination.

Key words: Cryopreservation, plasma membrane, acrosome, bull.