LA SUPLEMENTACIÓN DE SEMEN PORCINO DESCONGELADO CON PLASMA SEMINAL HETERÓLOGO NO MODIFICA LA PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES

Fernández-Gago, R., Mata-Campuzano, M., Besa, A., Peñacoba, M., Lorenzo, C., Domínguez, J. C. y Martínez-Pastor, F.

INDEGSAL, Universidad de León, 24071 León, España. felipe.martinez@unileon.es

INTRODUCCIÓN

La utilización de tecnologías de reproducción asistida ha supuesto un gran avance para la ganadería porcina. La conservación de semen mediante refrigeración y la inseminación artificial se utilizan rutinariamente, pero la criopreservación necesita ser mejorada. La utilización de semen congelado facilitaría la gestión productiva, la selección genética, y la utilización de otras técnicas de reproducción asistida (como el sexado espermático). Los espermatozoides de cerdo son muy sensibles al proceso de criopreservación (Grossfeld et al., 2008) y, aunque es posible obtener buenos resultados de fertilidad, el momento de ovulación debe ser estimado con gran precisión (Roca et al., 2003), obteniendo malos resultados si esto no es posible (Bolarín et al., 2009).

Los daños producidos por la criopreservación seminal son muy variados, destacándose los daños en las membranas, en orgánulos como el acrosoma y la mitocondria y en la cromatina. Las causas de estos daños son igualmente variados: choque frío, choque osmótico y radicales libres (Vadnais y Althouse, 2011). La producción de radicales libres es de gran interés, ya que estos participan en la regulación de numerosas vías de señalización intra-celular. Una producción excesiva no sólo puede causar daños directos debido al estrés oxidativo, sino también por la desregulación de procesos como la capacitación. La adición de plasma seminal o de alguno de sus componentes podría evitar o revertir estos efectos negativos (Vadnais et al., 2005). En la mayor parte de los trabajos realizados en cerdo, se ha ensayado una concentración del 10% de plasma seminal, con resultados variables en cuanto a fertilidad (Okazaki y Shimada, 2012).

García et al. (2010) obtuvieron resultados de fertilidad prometedores tras suplementar semen descongelado con un 50% de plasma seminal. En este trabajo presentamos resultados sobre la presencia de radicales libres (superóxido en la mitocondria y especies reactivas de oxígeno en el citoplasma) tras añadir un 50% de plasma seminal a semen descongelado de cerdo. Nuestra intención es determinar si los efectos de esta suplementación podrían estar mediados por una variación de la presencia de distintos tipos de radicales libres en el espermatozoide de cerdo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los reactivos generales fueron comprados a Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.), y los fluorocromos fueron comprados a Invitrogen (Carlsbad, CA, EE.UU.). Utilizamos dosis seminales de tres verracos de la raza Landrace y Large White. En cada sesión experimental se descongelaron 3 dosis (50 ºC 12 s), que se mezclaron y se diluyeron a 50×10^6 ml^{-1} con medio MR-A (Kubus S.A., Madrid, España). La muestra se dividió entre dos tubos y uno de ellos se suplementó con 50% de plasma seminal heterólogo (procedente de varios machos), dejando ambos a 37 ºC. Inmediatamente tras añadir el plasma seminal, se tomó una alícuota de cada tubo y se diluyó a 10^6 ml^{-1} en PBS para su análisis mediante citometría de flujo (marca). La presencia de especies reactivas del oxígeno intracelulares se detectó usando CM-H_2DCFDA (1 µM), con ioduro de propidio (2,5 µg/mL) para discriminar los espermatozoides muertos. Para determinar la presencia del radical superóxido en las mitocondrias, los espermatozoides se incubaron con 5 µM de *MitoSOX Red*, 100 nM de YO-PRO1 para discriminar los espermatozoides muertos/membrana alterada y 100 nM de *Mitotracker Deep Red* para determinar la actividad mitocondrial. Los tubos se incubaron 15 min a 37 ºC, añadiendo 2,5 µg/mL de Hoechst 33342 para identificar contaminantes (*debris*). El análisis se realizó con un citómetro de flujo CyAn ADP, provisto de tres lásers de diodos (405 nm —violeta—, 488 nm —azul— y 635 nm —rojo—). La fluorescencia fue recogida por fotodetectores provistos de filtros 450/50 (láser violeta, fluorescencia azul: Hoechst 33342), 530/40 (láser azul, fluorescencia verde: YOPRO1 y CM-H_2DCFDA), 613/20

(láser azul, fluorescencia roja: ioduro de propidio y MitoSOX) y 665/20 (láser rojo, fluorescencia roja: Mitotracker). El mismo análisis se repitió tras 1 h a 37 ºC. La especificidad del MitoSOX por el radical superóxido se comprobó utilizando MnTBAP (ácido 5,10,15,20-benzoico manganeso tetrakis porfirina) a 100 µM, que elimina específicamente el radical superóxido. MnTBAP causó una disminución considerable de la fluorescencia del MitoSOX. Este experimento se replicó 5 veces, y los datos se analizaron con el paquete estadístico R (http://www.r-project.org), utilizando modelos lineales de efectos mixtos (efectos fijos: incubación y plasma seminal; efectos aleatorios: replicado).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio hemos utilizado la sonda MitoSOX para evaluar la generación de radical superóxido en la mitocondria, siendo tal vez el primer informe sobre su uso en espermatozoides de cerdo. Pudimos observar que la viabilidad, relativamente baja tras la descongelación (55,3%±4,5, media±desv. est.), se redujo a la mitad durante la incubación (18,7%±6,9), mostrando la vulnerabilidad de los espermatozoides de porcino descongelados (Grossfeld et al., 2008). La suplementación con plasma seminal no modificó esta tendencia (Figura 1A). El porcentaje de espermatozoides con mitocondrias activas disminuyó igualmente (Figura 2A, % considerando sólo los espermatozoides viables). Estos resultados difieren de los que obtuvimos en un estudio anterior (Fernández-Gago et al., 2012), con un 69%±2 (media±C.I. 95%) de viabilidad tras descongelar, y un 54%±3 a 4 h (35% de los espermatozoides viables mostrando mitocondrias activas). Estos datos muestran la gran variabilidad de las muestras de cerdo tras la descongelación, incluso utilizando un *pool* para reducir las diferencias individuales.

Justo después de descongelar, la mayor parte de los espermatozoides presentó una fluorescencia alta con el MitoSOX, indicando una alta producción de superóxido en la mitocondria (Figura 1C, % de MitoSOX+, solo viables). Encontramos una disminución significativa con el tiempo, sin diferencias entre tratamientos. Respecto a los radicales libres intracelulares (Figura 1D), aunque no obtuvimos diferencias entre los tratamientos, el plasma seminal produjo un incremento significativo con el tiempo, mientras que en el control no encontramos ninguna variación.

Nuestros resultados sugieren una cierta estimulación de la producción de radicales libres distintos al superóxido cuando se suplementan las muestras con un 50% de plasma seminal, sin un claro efecto protector sobre la membrana o las mitocondrias. Estos resultados, aunque difieren con algunos estudios (Vadnais y Althouse, 2011), apuntan a un posible efecto estimulador sobre el espermatozoide mediado por un incremento de radicales libres citoplásmicos, los cuales podrían mediar en rutas de señalización (O'Flaherty y De Lamirande, 2006). Este tipo de efectos podrían ser la causa del incremento de fertilidad detectado anteriormente (García et al., 2010), indicando que el semen descongelado de cerdo podría beneficiarse de la suplementación con una proporción alta de plasma seminal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Bolarín A., Hernández M., Vázquez J.M., Rodríguez-Martínez H., Martínez E.A. & Roca J. 2009. J. Anim. Sci. 87:3967–75. • Fernández-Gago, R., González-Urdiales, R., Martín, D., Alegre, B., Domínguez, J. C. & Martínez-Pastor, F. 2012. Reprod. Domest. Anim. 47: Suppl. 3:92. • Garcia, J.C., Dominguez, J.C., Pena, F.J., Alegre, B., Gonzalez, R., Castro, M.J., Habing, G.G., Kirkwood, R.N., 2010. Anim. Reprod. Sci 119:160–165. • Grossfeld R, Sieg, B., Struckmann, C., Frenzel, A., Maxwell, W.M.C. & Rath, D. 2008. Theriogenology 70:1225–33. • O'Flaherty, C., De Lamirande, E. & Gagnon, C., 2006. Free Radic. Biol. Med. 41, 528–540. • Okazaki, T. & Shimada, M. 2012. Anim. Sci. J. 83:623–9. • Roca, J., Rodríguez-Martínez, H., Vázquez, J.M., Bolarín, A., Hernández, M., Saravia, F., Wallgren, M. & Martínez, E.A. 2006. Soc. Reprod. Fertil. Suppl. 62:261–75. • Vadnais, M.L. & Althouse, G.C. 2011. Theriogenology 76:1508–16.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto DPI2009-08424 (Diputación de León, España), por el PIRTU (Junta de Castilla y León) y por el programa Ramón y Cajal (RYC-2008-02560, MICINN, España). Los autores agradecen a CENTROTEC (León, España) por proporcionar las muestras de semen.

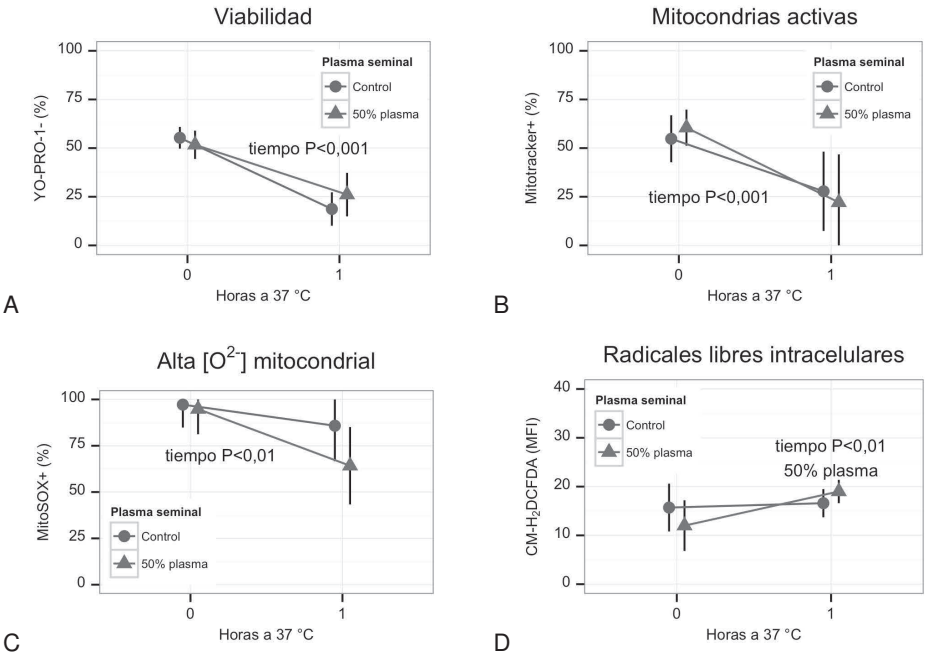


Figura 1. *Efecto del tiempo de incubación y del plasma seminal en espermatozoides descongelados de cerdo. Las gráficas muestran la proporción de espermatozoides en la población correspondiente (viables: 1A; mitocondrias activas, solo viables: 1B; alto nivel de superóxido solo viables: 1C) o la intensidad media de la fluorescencia (MFI, nivel de radicales libres intracelulares, solo viables: 1D). Las barras indican C.I. 95%.*

SUPPLEMENTATION OF THAWED BOAR SEMEN WITH HOMOLOGOUS SEMINAL PLASMA DOES NOT CAUSE A SHORT-TERM MODIFICATION OF INTRACELLULAR FREE RADICALS

Supplementation with seminal plasma could improve the quality of cryopreserved boar semen. We have tested if a short incubation of post-thawed boar spermatozoa with 50% of homologous seminal plasma modify the levels of free radicals. We obtained five semen pools from frozen semen doses (three males) and evaluated the sperm viability (YOPRO1 or propidium iodide), the mitochondrial activity (Mitotracker deep red), the production of mitochondrial superoxide (MitoSOX) and the intracellular free radicals (CM-H_2DCFDA) using flow cytometry. Samples were assessed just after thawing (control and adding 50% seminal plasma) and after 1 h of incubation at 37 ºC. Incubation decreased viability, mitochondrial activity and mitochondrial superoxide production, with no significant effect of seminal plasma. The levels of intracellular free radicals did not change in the control, but they increased at 1 h in the 50% seminal plasma treatment. We could no detect a protective effect of seminal plasma in this study, but our results suggest an increase of intracellular free radicals with time. This could be associated to the stimulation of signalling pathways, which could be associated to the positive effects found in previous studies.

Keywords: boar semen, seminal plasma, flow cytometry, MitoSOX.