EVALUACIÓN DEL COLOIDE *ANDROCOLL*™ PARA SELECCIONAR ESPERMATOZOIDES DESCONGELADOS DE CIERVO

Crespo-Félez, I., Pardal, S., Mata-Campuzano, M., Castañeda, A., Morrell, J. y Martínez-Pastor[1], F.
[1]INDEGSAL, Universidad de León, 24071 León, España.felipe.martinez@unileon.es

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de técnicas reproductivas para especies domésticas y silvestres ha supuesto un gran avance en producción y conservación animal. La criopreservación seminal es una de las técnicas más valiosas, ya que permite conservar indefinidamente los espermatozoides. Sin embargo, la criopreservación es un proceso muy estresante, que frecuentemente disminuye la fertilidad de las dosis (Johannisson et al., 2009). Una estrategia consiste en aplicar gradientes de selección espermática (Watson, 2000), tanto antes (Heutelbeck et al., 2015) como después (Dorado et al., 2013) de criopreservar. La centrifugación de gradiente en un sola capa (SLC, single layer centrifugation) es una técnica diseñada para seleccionar, mediante un coloide, espermatozoides con buena movilidad, integridad de la membrana, morfología normal y cromatina intacta (Morrell et al., 2009). Este coloide se ha adaptado a distintas especies, siendo el Androcoll-O™ el diseñado para ovino. Mata-Campuzano et al. (2013) utilizaron este coloide con espermatozoides de ciervo rojo *(Cervus elaphus hispanicus*), seleccionando una subpoblación con unos parámetros fisiológicos de calidad mejorados. El fin del presente estudio es comparar varios protocolos con Androcoll-O™ en cuanto a su eficacia para la selección de espermatozoides descongelados de ciervo rojo, así como la caracterización de los espermatozoides seleccionados y retenidos.

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 carneros y muestras epididimarias de ciervo, congeladas en medio Tris-citrato-fructosa (20% yema de huevo y 8% glicerol), a 10^8 espermatozoides/ml. Se realizaron 4 sesiones experimentales. En cada una se descongelaron 6 dosis (37 °C, 30 s), que se mezclaron para conseguir un pool. Se prepararon cuatro tubos con 1 ml de Androcoll-O-S (*small*, optimizado para volúmenes pequeños de muestra), y se preparó un diseño factorial en el que se cruzaron dos volúmenes de muestra (150 µl y 300 µL de pool) y dos regímenes de centrifugación —RCF— (300×g y 600×g). Los tubos se centrifugaron durante 20 min. Se preparó un tubo control con 50 µl del pool y 500 µl de TALP-Hepes, que no se centrifugó. Tras la centrifugación se tomó una alícuota de la interfase y se eliminó todo el sobrenadante. Tanto la interfase como el pellet se diluyeron con TALP-Hepes y se analizaron. Se determinó la concentración (hemocitómetro Bürker) tanto del pool como del pellet, estimándose los espermatozoides iniciales como los recuperados y calculándose una tasa de recuperación como recuperados/iniciales×100. Los espermatozoides de la muestra control, de la interfase y el pellet de cada tratamiento fueron analizados mediante citometría de flujo tras teñirlos con las sondas YO-PRO-1 (100 nM), ioduro de propidio (3 µM), Mitotracker deep red (100 nM) y Hoechst 33342 (5 µM) durante 15 min a 37 °C. El análisis se realizó con un citómetro CyAn ADP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), provisto de tres lásers de diodo (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), 613/20 (láser azul, fluorescencia roja: ioduro de propidio) y 665/20 (láser rojo, fluorescencia roja: Mitotracker deep red). Los datos se analizaron con el paquete estadístico R (http://www.r-project.org), utilizando modelos lineales de efectos mixtos (efectos fijos: volumen de muestra y RFC; efectos aleatorios: replicado). Los resultados se indican como media±desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El coloide Androcoll permite una rápida preparación y recuperación de los espermatozoides, ya que consta de una sola fase. Los espermatozoides recuperados en el pellet representan una población de células de mayor densidad, que es capaz de atravesar el coloide. Coincidiendo con estudios previos (Dorado et al., 2013; Morrell et al. , 2009), la fracción

seleccionada mostró un mayor porcentaje de espermatozoides viables (YO-PRO-1$^-$, Figura 1a) y con mitocondrias activas (Mitotracker$^+$, Figura 1b), así como una menor proporción de espermatozoides "apoptóticos" (Figura 1c). Este último parámetro se estimó como la proporción de espermatozoides YO-PRO-1$^+$ (permeabilidad de membrana alterada) dentro de la población de viables (ratio de apoptosis). Las diferencias entre los distintos protocolos respecto a la calidad espermática fueron pequeñas, aunque detectamos una interacción (P<0,05) entre la fracción aislada (pellet vs. interfase) y las RCF (300×g y 600×g) para viabilidad y actividad mitocondrial. Mientras que no hubo diferencias destacadas para la interfase, el pellet mostró unos valores algo mayores para 300×g en actividad mitocondrial (89,0%±3,3 vs. 83,9%±6,5; P=0,008). En cuanto a recuperación (espermatozoides en el pellet / espermatozoides iniciales), obtuvimos como media 34,5%±13,3, con un número absoluto de espermatozoides recuperados de 4,3±1,7 $\times 10^6$ mL^{-1} para 300×g y 7,1±2,6 $\times 10^6$ mL^{-1} para 600×g (concentración media del pool: 76,1±9,1 $\times 10^6$ mL^{-1}). Si bien no hubo diferencias claras entre protocolos, encontramos una interacción significativa (P=0,028) entre las RCF y el volumen de muestra utilizado (Figura 1d). Mientras que a 300×g los resultados fueron similares, aumentando a 600×g paradójicamente resultó en una ligera disminución en la recuperación cuando utilizamos 300 µL de muestra (P=0,037). Posiblemente, el aumento de RCF cause una formación rápida de la capa de interfase, impidiendo que los espermatozoides viables pasen eficientemente al coloide si la cantidad de células es excesiva.

No existen muchos estudios en los que se utilice Androcoll con semen descongelado. Dorado et al. (2013) obtuvieron una recuperación mayor que la nuestra en semen descongelado de perro (63,3% vs. 34,5% de media), usando Androcoll-C (para perro). No obstante, la viabilidad obtenida en la fracción seleccionada fue solo del 54% (87,0% en nuestro caso). En rumiantes, Jiménez-Rabadán et al. (2012) utilizaron Androcoll-B (para toro) con semen descongelado de cabra, obteniendo una recuperación media menor que la nuestra (13,6%±2,6). Estos autores obtuvieron parámetros de viabilidady actividad mitocondrial mejorados (antes de SLC: ~30% y ~0%; después: ~80% y ~55%). Las diferencias con estos trabajos podrían deberse no solo a las especies, protocolos de congelación y tipos de Androcoll, sino también al tipo de muestras utilizadas en este trabajo, obtenidas de la cola del epidídimo (posiblemente más resistentes a la criopreservación y al estrés que el semen eyaculado).

En conclusión, el Androcoll-O-S nos ha permitido, de una forma muy sencilla, recuperar una población de alta calidad a partir de dosis descongeladas de ciervo rojo. Este trabajo confirma los resultados obtenidos anteriormente (Mata-Campuzano et al., 2013). Además, hemos encontrado una dependencia entre las RCF y la cantidad de espermatozoides aplicados, indicando que estos parámetros deben ajustarse conjuntamente en los distintos protocolos. Considerando los resultados de este trabajo y con una concentración espermática similar, recomendaríamos utilizar una columna por dosis de semen (~150 µL), con 600×g como RCF que permite mayor recuperación con una buena calidad en el pellet.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Dorado, J., Gálvez, J. M., Morrell, J. M., Alcaráz, L. & Hidalgo, M. 2013. Theriogenology 80: 955-62. • Heutelbeck, A., Oldenhof, H., Rohn, K., Martinsson, G., Morrell, J. & Sieme, H. 2015. Reprod. Domest. Anim. 50:76-83. • Jiménez-Rabadán, P., Morrell,J. M., Johannisson, A., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Álvaro-García, P. J. et al., 2012. Anim. Reprod. Sci. 136:47-54. • Johannisson, A., Morrell, J.M., Thorén, J., Jönsson, M., Dalin, A.M. & Rodriguez-Martinez, H. 2009. Anim. Reprod. 116:119-28 • Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Campillo, I., Palacios-Aguado, A., Fuertes, C., Redondo-Blanco, S., Alonso-Molero, J. & Martínez-Pastor, F. 2013. XV Jornadas sobre Producción Animal AIDA. • Morrell, J.M., Dalin, A.M. & Rodríguez-Martínez, H. 2009. Equine Vet. J. 41: 53-58.• Watson P. F. 2000. Anim. Reprod. Sci. 60-61:481-492

Agradecimientos: Los autores agradecen a la Facultad de Veterinaria de la Universidad Sueca de Ciencias Agrarias (SLU) por haber financiado en parte este estudio.

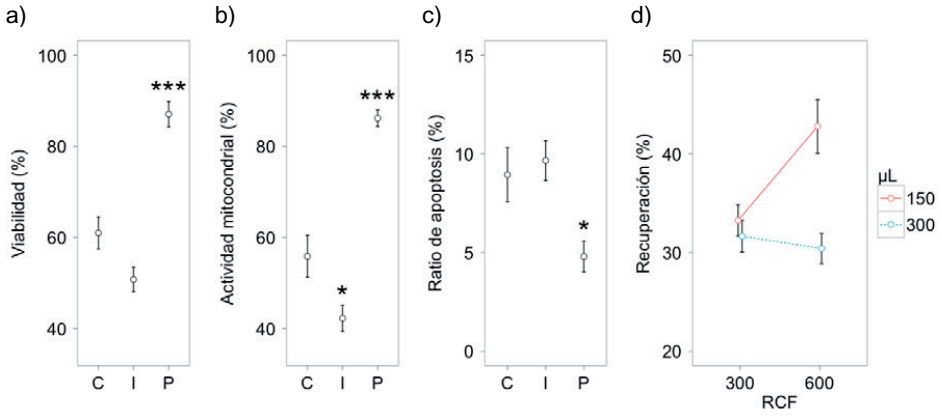


Figura 1. *Las subfiguras a-c muestran las diferencias de calidad entre la muestra sin seleccionar (Control, C), los espermatozoides retenidos en la interfase (I) y los espermatozoides seleccionados (pellet, P). Los asteriscos indican diferencias con el Control (* P<0,05; *** P<0,001). La recuperación de espermatozoides en el pellet (d) fue afectada por una interacción entre el volumen de muestra y las RCF. Se muestran medias±SEM.*

EVALUATION OF THE *ANDROCOLL*™ COLLOID FOR THAWED SPERMATOZOA SELECTION IN RED DEER

ABSTRACT: Selection of the optimal spermatozoa population is a necessary step in reproductive techniques, and it increases the quality and resilience of spermatozoa. Androcoll is a single-layer selection colloid that has been adapted to many species. We tested Androcoll-O-S (for sheep and small volumes) for selecting cryopreserved spermatozoa from red deer. Samples were collected from the cauda epididymis, frozen (20% egg yolk, 8% glycerol) and selected post-thawing. We tested two sample volumes, 150 and 300 µL, and two RCF, 300 and 600×g (20 min), in a 1-mL Androcoll volume. Analysis (flow cytometry, YO-PRO-1/propidium iodide/Mitotracker deep red) of selected cells (pellet) resulted in improved viability (87.3%±10.9), mitochondrial activity (86.5%±5.7) and apoptotic ratio (4.8%±2.2) than the unselected control (61.4%±10.8, 56.1%±8.2, 8.9%±2.7), with 300×g achieving slightly higher results for mitochondrial activity. Low quality spermatozoa (48.4%±9, 39.4%±10.2, 9.9%±5.1) were retained in the interphase. Recovery (selected/unselected cells, overall 29.1%±10.9) showed an interaction between volume and RCF, with increasing RCF not improving recovery when using 300 µL at 600×g (26.2%±10.1 vs. 34.3%±13.5 for 150 µL), maybe because a higher number of cells at these RCF could impair that high-quality cells enter the colloid. Androcoll-O-S is convenient and effective for selecting high-quality spermatozoa from thawed red deer.

Keywords: red deer, Androcoll, recovery, sperm selection.