

ACTIVACIÓN DE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA DE VERRACO POST-DESCONGELACIÓN

Gómez-Fernández¹, J., Tomás², C., Gómez-Izquierdo¹, E. y de Mercado¹, E.

¹ Centro de Pruebas de Porcino del ITACyL. Ctra. Riaza-Toro s/n, 40353 Hontalbilla (Segovia). ² CITA-IVIA. Apdo. 187. 12400- Segorbe (Castellón). España. ita-merpened@itacyl.es

INTRODUCCIÓN

Entre los principales parámetros utilizados para determinar la calidad espermática, se encuentran la evaluación de la integridad de la membrana y la motilidad. Uno de los problemas observados en el semen de verraco post-descongelación, es que en ocasiones no existe una relación entre el porcentaje de espermatozoides con la membrana plasmática intacta y el porcentaje de espermatozoides móviles, observándose un número más bajo de espermatozoides móviles que de espermatozoides vivos. Esta pérdida de motilidad de algunos de los espermatozoides viables, es potencialmente reversible, pero las causas no están del todo establecidas. Algunos autores lo atribuyen a una reducción del agua intracelular, que podría incrementar la fricción en la cola causando una inhibición del deslizamiento de los microtúbulos o de otros elementos estructurales en el flagelo (Gao et al., 1993; Wolders et al., 1997), mientras que otros autores consideran que puede ser debida a un fallo metabólico temporal que causa cambios en el contenido de ATP y un aumento del calcio intracelular (Januskauskas y Rodríguez-Martínez, 1995; Fraser et al., 2001).

Dicha pérdida de motilidad es reversible, porque Corcuera et al., (2007) demostraron que mediante el uso de cafeína se podía recuperar gran parte de la motilidad perdida post-descongelación en la especie porcina, pero las causas de cómo actúa dicha cafeína tampoco están del todo establecidas. Un componente esencial para que se pueda llevar a cabo la motilidad es el bicarbonato. Muchos estudios determinaron que el aumento de este compuesto desencadena un aumento de la motilidad de la célula (Satake et al., 2006; Garzón et al., 2008). Recientemente se ha demostrado que la producción de bicarbonato en estas células viene determinada por la glicolisis, la cual a su vez está mediada por el pH (Mannowetz et al., 2012), y ya que el pH básico aumenta la motilidad espermática (Gatti et al., 1993; Garzón et al., 2008), es posible que el pH del medio influya notablemente en la recuperación o activación de la motilidad espermática.

Por todo esto, el objetivo de este trabajo fue comparar la cafeína y el pH básico, solos o en conjunto, sobre la recuperación de la motilidad espermática de aquellos espermatozoides de verraco inmóviles pero vivos post-descongelación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se han utilizado los eyaculados de 3 verracos de raza Pietrain (Prosepor S.A., Segovia, España) recuperados durante 5 semanas consecutivas. Los eyaculados fueron diluidos 1:1 en una solución comercial de *Beltsville Thawing Solution* (BTS, Minitube, Alemania) y transportados a 15 °C hasta el laboratorio donde fueron procesados, presentando valores mínimos de 80 % de espermatozoides vivos y 75 % de espermatozoides móviles. La congelación se realizó siguiendo el protocolo desarrollado por Westendorf et al. (1975) y modificado por Thurston et al. (1999) y Carvajal et al. (2004), usando como medio de congelación el diluyente Lactosa-yema de huevo-Glicerol. Las pajuelas se descongelaron en un baño de agua a 37 °C durante 20 s.

Se realizaron un total de 8 tratamientos ordenados de forma factorial: 4 diluyentes para la descongelación, y presencia o ausencia de cafeína, para cada una de las 5 semanas de extracción de semen. Así, en el tratamiento A fueron descongeladas en BTS con pH 7, en el tratamiento B en BTS a pH 8, en el tratamiento C en BTS a pH 9 y el tratamiento D a pH 10. A su vez de cada tratamiento se analizó la motilidad con o sin cafeína, incubando las muestras 10 minutos en BTS solo (tratamientos, A, B, C y D) o en BTS con 2 mM de cafeína (Sigma-Aldrich Quimica, S.A. (Madrid, Spain) durante 10 minutos (Tratamientos Ac, Bc, Cc y Dc). La calidad espermática fue determinada a los 30 minutos de incubación.

La calidad del movimiento espermático fue analizada mediante un sistema CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis System*; ISAS version 1.0.17, Proiser; Valencia, España). Para cada análisis se depositaron 3 μ l de las muestras diluidas (25×10^6 espermatozoides/ml) sobre una cámara Makler atemperada a 39 °C y se analizaron un mínimo de 3 campos con al menos 150 células/campo. En los resultados obtenidos se tuvieron en cuenta la proporción de espermatozoides móviles totales (% EMT) y móviles progresivos (% EMP). Además se midieron los parámetros cinéticos de velocidad curvilínea (VCL, μ m/s), velocidad rectilínea (VSL, μ m/s), velocidad media (VAP, μ m/s), índice de linealidad (LIN, %), índice de rectitud (STR, %), índice de oscilación (WOB, %), amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH, μ m) y la frecuencia de batida de la cabeza (BCF, Hz). La viabilidad de los espermatozoides fue analizada por microscopía de fluorescencia mediante una doble tinción fluorescente con Ioduro de propidio (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Países Bajos) (espermatozoides con membrana dañada/muertos) y SYBR-14 (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Países Bajos) (espermatozoides con membrana intacta/vivos): un mínimo de 200 células fueron contadas y solo se tuvo en cuenta el porcentaje de espermatozoides vivos totales (% VT). Las diferencias entre las variables de calidad post-descongelación entre tratamientos fueron contrastadas mediante un análisis GLM con el paquete estadístico SAS (Version 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, EE.UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al observar resultados (Tabla 1) teniendo en cuenta solo el pH del BTS, la mayor motilidad total y progresiva se observó a pH 9 (aunque sin diferencias significativas respecto al control (Tratamiento A). La combinación de pH con la cafeína mostró que el de pH 8 tenía mayores valores de motilidad, siendo diferente significativamente del control ($P < 0,05$). Como observó Corcuera et al. (2007) la cafeína es capaz de recuperar parte de la motilidad inhibida post-descongelación. Además como han observado otros autores (Gatti et al., 1993; Garzón et al., 2008), el pH básico aumenta la motilidad, y en este caso permite recuperar, al igual que la cafeína, esa motilidad inhibida. Pero por encima de pH 9 el efecto sobre los espermatozoides es deletéreo afectando a la viabilidad e inhibiendo casi por completo la motilidad.

La consecuencia de combinar la cafeína y el pH básico parece tener un efecto beneficioso cuando el pH es de 8, pero al aumentar el pH el efecto es perjudicial, disminuyendo el porcentaje de espermatozoides móviles totales y progresivos. Además se puede observar que las velocidades (VSL, VCL y VAP) al aumentar el pH y combinar con la cafeína también descienden notablemente. Sin embargo las variables de linealidad (LIN, STR y WOB) así como ALH y BCF no se ven afectadas salvo en el pH 10 donde todas las variables con o sin cafeína se ven drásticamente reducidas. El que el aumento de pH cambie el efecto de la cafeína sobre la motilidad puede ser debido a que las metilxantinas (grupo al que pertenece la cafeína) tienen un efecto diferente según el pH sobre ciertas enzimas como la fosfatasa alcalina (Glogowski et al., 2002), por tanto su actividad está notablemente influida por el pH. El que el pH básico mejore las variables de calidad espermática tiene su explicación en que es fisiológicamente necesario aumentar dicho pH para que se lleve a cabo la activación enzimática del espermatozoide (Akama et al., 1994), para la correcta pre-implantación del embrión (Ben-Yosef et al., 1996) y también para fomentar la glicólisis que conllevará un aumento del bicarbonato y con ello de la motilidad (Mannowetz et al., 2012).

En conclusión, se puede determinar que la cafeína en un medio con pH 8 es capaz de recuperar casi por completo la motilidad inhibida de algunos espermatozoides vivos después del proceso de congelación-descongelación, pero es necesario realizar estudios futuros para determinar la capacidad fecundante de estos espermatozoides.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akama, K., Terao, K., Tanaka, Y., Noguchi, A., Yonezawa, N., Nakano, M. & Tobita, T. 1994. Epididymal Sperm. *J. Biochem.* 116: 464-470.
- Ben-Yosef, D., Oron, Y. & Shalgi, R. 1996. *Biol. Reprod.* 55: 461-468.
- Carvajal, G., Cuello, C., Ruiz, M., Vázquez, J. M.,

Martínez, E. A. & Roca, J. 2004. *J. Androl.* 25: 389-396. • Fraser, L., Gorszczaruk, K. & Strzezek, J. 2001. *Reprod. Dom. Anim.* 36: 325-329. • Gao, D. Y., Ashworth, E., Watson, P. F., Kleinhans, F. W., Mazur, P. & Critser, J. K. 1993. *Biol. Reprod.* 49: 112-123. • Garzón, D. L., Peñaranda, D. S., Pérez, L., Marco-Jiménez, F., Espert, X., Müller, T., Jover, M. & Asturiano, J. F. 2008. *Reprod. Dom. Anim.* 43: 99-105. • Gatti, J. L., Chevrier, C., Paquignon, M. & Dacheux, J. L. 1993. *J. Reprod. Fertil.* 98: 439-449. • Januskauskas, A. & Rodriguez-Martinez H. 1995. *Acta Vet. Scand.* 36: 571-574. • Glogowski, J., Danforth, D. R., & Ciereszko, A. 2002. *J. Andro.* 23: 783-792. • Mannowetz, N., Wandernoth, P. M. & Wennemuth, G. 2012. *PLoS One.* 7: 1-15. • Satake, N., Elliott, R. M. A., Watson, P. F. & Holt, W. V. 2006. *J. Exp. Biol.* 209: 1560-1572. • Thurston, L. M., Watson, P. F. & Holt, W. V. 1999. *Cryobiology.* 39: 335. • Westendorf, P., Richter, L., & Treu, H. 1975. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 82: 261-267. • Wolders, H., Matthijs, A. & Angel, B. 1997. *Cryobiology.* 35: 93-105.

Agradecimientos: Trabajo financiado por el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León; Ref. 2010/1282).

Tabla 1. Calidad espermática post-descongelación de los diferentes tratamientos.

	A	Ac	B	Bc	C	Cc	D	Dc	EEM
% VT	52,7 ^a		54,9 ^a		54,9 ^a		39,2 ^b		2,43
% EMT	42,76 ^{ac}	47,82 ^a	53,3 ^{ab}	61,3 ^b	59,88 ^{ab}	27,94 ^c	2,68 ^d	1,72 ^d	3,85
% EMP	37,48 ^{ac}	42,16 ^{abc}	46,82 ^{ab}	55,06 ^b	52,16 ^{ab}	24,56 ^c	1,32 ^d	1,12 ^d	3,65
VCL	68,06 ^{ab}	74,25 ^a	69,94 ^{ab}	67,52 ^{ab}	65,08 ^{ab}	56,66 ^b	32,1 ^c	24,98 ^c	4,45
VSL	48,76 ^{ab}	55,33 ^a	51,06 ^a	49,56 ^{ab}	45,02 ^{ab}	39,72 ^b	16,54 ^c	12,42 ^c	2,92
VAP	56,36 ^{ab}	63,23 ^a	59,18 ^a	57,38 ^{ab}	55,34 ^{ab}	56,78 ^b	20,84 ^c	17,24 ^c	3,45
LIN	71,64 ^a	71,94 ^a	73 ^a	73,44 ^a	69,32 ^a	70 ^a	41,22 ^b	39,3 ^b	5,81
STR	86,44	84,32	86,3	86,46	81,56	84,6	62,54	58,04	7,91
WOB	82,8 ^a	82,25 ^{ab}	84,58 ^a	84,94 ^a	84,98 ^a	82,54 ^{ab}	52,1 ^c	54,52 ^{bc}	7,21
ALH	2,34 ^a	2,28 ^a	2,26 ^a	2,1 ^a	2,1 ^a	2,02 ^a	1,64 ^{ab}	0,9 ^b	0,22
BCF	8,02 ^a	7,85 ^a	8,22 ^a	8,06 ^a	8,36 ^a	8 ^a	7,34 ^a	2,76 ^b	0,81

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$). EEM: Error estándar de la media. Tratamientos: A: Control (BTS pH 7); Ac: A + Cafeína (2 mM); B: BTS pH 8; Bc: B + Cafeína (2 mM); C: BTS pH 9; Cc: C + Cafeína (2 mM); D: BTS pH 10; Dc: D + Cafeína (2 mM);

POST-THAWING ACTIVATION OF BOAR SPERM MOTILITY

ABSTRACT: The aim of this study is to determinate if the basic pH and the caffeine, factors that increase the velocity of sperm, are able to recover the latent motility. The effect of the pH in the thawing extender (BTS) to values of 7, 8, 9 and 10, on sperm motility and on sperm viability was evaluated. And for each pH the effect of the use of caffeine (2 mM) or not, on the sperm motility was also evaluated. The results showed that pH above 9, is harmful for the sperm motility and viability. Without caffeine the sperm motility is recovered in more proportion at pH 8 and 9 than control sperm (pH 7 and without caffeine), but without significant difference ($P > 0.05$). And the combination of basic pH (above 8; pH 9 and 10) and caffeine, was harmful for the sperm motility and viability. However, the thawing extender at pH 8 and with caffeine showed greater motility values than control sperm (percentage of total motile sperm): 42.76 vs 61.3; percentage of progressively motile sperm: 37.48 vs 55.06; $P < 0.05$). In conclusion, the thawing extender at pH 8 with caffeine (2 mM) is able to recover almost completely the post-thawing latent motility.

Keywords: boar sperm, motility, pH, caffeine.