

INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE COLESTEROL AL SEMEN DE VERRACO Y EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO A 16°C SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN CONGELADO

Blanch¹, E., Tomás¹, C., Mocé², ML., Viudes de Castro¹, MP., Vicente³, JS., Mocé^{1α}, E.

¹CITA-IVIA, Segorbe (Castellón), España. ²UCH-San Pablo CEU, Moncada (Valencia), España. ³ICTA-UPV, Valencia, España.

^αE-mail: moce_eva@gva.es

INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides de verraco son especialmente sensibles a los fenómenos asociados con los procedimientos de congelación (Polge, 1956). Esta sensibilidad es debida, en parte, al bajo ratio colesterol:fosfolípidos que presentan en su membrana (Darin-Bennet y White, 1977). En otras especies con bajo ratio colesterol:fosfolípidos (toros, moruecos, caballos, burros y machos cabríos) se ha observado que la supervivencia de los espermatozoides al proceso de criopreservación mejora cuando son tratados con ciclodextrinas saturadas de colesterol (Combes et al., 2000; Purdy y Graham, 2004; Morrier et al., 2004; Barrera-Compean et al., 2005; Alvarez et al., 2006).

El protocolo de congelación más utilizado para los espermatozoides de verraco es el descrito por Westendorf et al. (1975), en el que los espermatozoides son incubados o equilibrados durante 3h a 16°C con su plasma seminal previamente a la congelación. Se ha observado que el periodo de incubación con plasma seminal confiere a los espermatozoides resistencia al "cold-shock" (Pursel et al., 1972, 1973; Tamuli y Watson, 1994), pudiendo llegar a incubarlos durante 24h sin que ello repercuta negativamente sobre la calidad espermática pre y post-congelación (Guthrie y Welch, 2005). Este largo periodo de incubación o equilibrado permitiría un traslado del semen desde el punto de recolección hasta un laboratorio de congelación relativamente lejano.

Los objetivos de este trabajo son determinar si el tratamiento de los espermatozoides de verraco con ciclodextrinas saturadas de colesterol previamente a la congelación mejora su supervivencia a la criopreservación y determinar si el periodo de equilibrado de los espermatozoides con plasma seminal tiene influencia en los resultados obtenidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron las fracciones ricas de 15 eyaculados recolectados mediante masaje manual procedentes de 9 verracos de raza Pietrain. Se diluyeron 1:1 con solución BTS a 37°C. El protocolo de congelación utilizado fue el descrito por Westendorf et al. (1975) y modificado por Gadea et al. (2005). El semen fue atemperado hasta 22°C durante 1-3 h. Se determinó la motilidad, concentración y volumen. Las ciclodextrinas saturadas de colesterol (CLC) se prepararon según la técnica descrita por Purdy y Graham (2004). Todas las muestras CLC se trataron con 1,5 mg de metil-β-ciclodextrina saturada de colesterol/120 x 10⁶ espermatozoides.

El semen fue dividido en 2 grupos de muestras: A y B. El grupo A estaba formado por 2 muestras, una tratada con CLC antes del periodo de equilibrado (CLC 2h) y otra muestra no tratada (CTRL 2h), ambas sometidas a un periodo equilibrado (PE) de 2h. El grupo B estaba formado por 3 alícuotas, una tratada con CLC antes del PE (CLC 24h A), otra tratada con CLC después del PE y antes de la centrifugación (CLC 24h B) y otra muestra no tratada (CTRL 24h). Las tres alícuotas del grupo B fueron sometidas a un PE de 24h. Al terminar el PE todas las muestras se centrifugaron a 800g durante 10 min a 16°C, se descartó el plasma seminal y el pellet fue resuspendido en medio lactosa-yema de huevo (Westendorf et al., 1975) hasta una concentración de 225 x 10⁶ espermatozoides/mL.

Posteriormente, las muestras fueron enfriadas lentamente hasta 5°C durante 2 h, y después fueron diluidas (2:1; v:v) con diluyente lactosa-yema de huevo con 1,5% de Orvus es Paste y 9% de glicerol hasta una concentración final de 150 x 10⁶ espermatozoides/mL y 3% de glicerol. El semen fue congelado en pajuelas de 0,5 mL a 4 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido durante 20 min y almacenado en nitrógeno líquido.

La descongelación se realizó en baño de agua a 39°C durante 30 seg. La viabilidad se evaluó siguiendo el protocolo descrito por Purdy y Graham (2004) mediante un citómetro de flujo Coulter Epics XL-MCL (Beckman Coulter Inc., Miami, FL) con un láser argón de 488 nm y tiñendo los espermatozoides con SYBR 14 y yoduro de propidio. La motilidad total y progresiva se evaluó tras un periodo de equilibrado a 39°C durante 10 min, mediante un sistema computerizado de análisis de la movilidad (ISAS versión 1.0.17, Proiser, Valencia, España) diluyendo las muestras hasta 25×10^6 espermatozoides/mL con solución BTS suplementada con 6% BSA. Las observaciones se realizaron en semen fresco y después del PE (motilidad total y progresiva) e inmediatamente tras la descongelación (viabilidad, motilidad total y progresiva). El efecto de la adición de CLC y el periodo de equilibrado (5 niveles) sobre los porcentajes de espermatozoides vivos, móviles totales y móviles progresivos se analizaron mediante un procedimiento MIXED (SAS) con el efecto eyaculado como efecto aleatorio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la criopreservación se produce una desorganización lipídica en la membrana plasmática del espermatozoide. La presencia de altos niveles de colesterol en membrana reduce este fenómeno (Watson, 1981). Al contrario de lo que se ha observado en otras especies con bajo ratio colesterol:fosfolípidos (Purdy y Graham, 2004; entre otros), ninguno de los tratamientos con CLC mejoró el porcentaje de espermatozoides vivos ni el de móviles totales tras la descongelación (Tabla 1, $P > 0,05$). No obstante, la motilidad progresiva tras finalizar el PE a 16°C mejoró tras el tratamiento con CLC antes de periodo de equilibrado (CTRL=38,86±5,75 vs CLC2h=48,27±5,75 y CLC24h=57,27±5,75, $P < 0,05$, Tabla 1). Sin embargo, este efecto no se mantuvo tras la descongelación (Tabla 1, $P > 0,05$), quizá porque la concentración de CLC ensayada o el momento de adición no fueron los adecuados.

De acuerdo con otros estudios se ha observado que prolongar el PE hasta las 24h no tiene un efecto negativo sobre los resultados post-descongelación (Guthrie y Welch, 2004). Así, no se observaron diferencias significativas entre los dos PE (2h ó 24h) para los parámetros evaluados tras la descongelación en ninguno de los tipos de muestra (CTRL o CLC, $P > 0,05$, Tabla 1). Sin embargo, se observó un porcentaje significativamente mayor de espermatozoides móviles progresivos a 16°C al prolongar el PE hasta 24h en las muestras tratadas con CLC antes del PE ($P < 0,05$, Tabla1). Por otro lado, Eriksson et al. (2001) describieron una mejora en el porcentaje de viabilidad al utilizar un PE de 10h o 20h y un descenso de la motilidad total tras someter a los espermatozoides a un PE de 20h, sin embargo no observaron influencia del PE prolongado sobre la capacidad de penetración de los espermatozoides descongelados.

En conclusión, contrariamente a lo esperado, el tratamiento con colesterol no mejoró la supervivencia de los espermatozoides de verraco tras la congelación. Por otro lado, prolongar el PE hasta 24h parece no afectar a la calidad postdescongelación del semen, aunque en ambos casos sería necesario realizar estudios complementarios sobre la capacidad funcional de los espermatozoides tales como el test de interacción entre gametos o pruebas de fertilidad in vivo y desarrollo embrionario.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, A.L., Serres, C., Torres, P., Crespo, F., Mateos, E., Gómez-Cuétara, C. 2006. *Anim Reprod Sci* 94:89-91.
- Barrera-Compean, M.H., Purdy, P.H., Dzakuma, J.M., Newton, G.R., Nuti, L.C. 2005. *J Anim Sci Suppl* 83; suppl 1; 153.
- Combes, G.B., Varner, D.D., Schroeder, F., Burghardt, R.C., Blanchard, T.L. 2000. *J Reprod Fertil Suppl* 56:127-132.
- Darin Bennett, A., White, IG. 1977. *Cryobiology* 14:466-470.
- Eriksson, B.M., Vázquez, J.M., Martínez, E.A., Roca, J., Lucas, X., Rodríguez-Martínez, H. 2001. *Theriogenology* 55:1593-1605.

- Gadea, J., Gumbao, D., Matas, C., Romar, R. 2005. J Androl 26:749-756.
- Guthrie, H.D., Welch, G.R. 2005. Theriogenology 63:396-410.
- Morrier, A., Thériault, M., Castonguay, F., Bailey, J. 2004. Proceedings of the Society for the Study of Reproduction Meeting. Vancouver, Canadá. P239 Abstract 636.
- Polge, C. 1956. Vet Rec 68:62-76.
- Purdy, P.H., Graham, J.K. 2004. Cryobiology 48:36-45.
- Pursel, V.G., Johnson, L.A., Schulman, L.L. 1972. J Anim Sci 35:580-584.
- Pursel, V.G., Johnson, L.A., Schulman, L.L. 1973. J Anim Sci 37:528-531.
- Tamuli, M.K., Watson, P.F. 1994. Vet Rec 135:60-162.
- Watson PF. 1981. Effects of low temperatures on biological membranes. Academic Press, 189-218.
- Westendorf, P., Richter, L., Treu, H. 1975. Dtsch Tierarztl Wochenschr 82:261-267.

Tabla 1. Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos tras ser sometidos a dos fases de incubación a 16°C (2h ó 24h) y tras ser tratados con ciclodextrinas saturadas de colesterol antes o después de terminar la fase de incubación a 16°C (clc A, clc B, respectivamente) o no ser tratados (ctrl). ^{A, B, C} Medias en la misma columna con superíndices no coincidentes, son diferentes (P < 0,05).

	TRAS INCUBACIÓN 16°C		TRAS DESCONGELACIÓN		
	M. Total	M. Progresiva	Viabilidad	M. Total	M. Progresiva
ctrl 2h	72,07 ± 5,6	38,86 ± 5,75 ^C	52,47 ± 2,14	24,07 ± 3,37	20,87 ± 3,14
clc 2h	67,67 ± 5,6	48,27 ± 5,75 ^B	53,62 ± 2,20	21,89 ± 3,41	17,52 ± 3,18
ctrl 24h	68,00 ± 5,6	46,07 ± 5,75 ^{BC}	52,74 ± 2,14	23,87 ± 3,37	20,80 ± 3,14
clc 24h A	70,13 ± 5,6	57,27 ± 5,75 ^A	51,50 ± 2,14	24,13 ± 3,37	20,67 ± 3,14
clc 24h B	64,20 ± 5,6	46,27 ± 5,75 ^{BC}	52,95 ± 2,14	20,67 ± 3,37	17,33 ± 3,14

Agradecimientos: Este trabajo ha sido cofinanciado por los proyectos AGL 2006-07769 y GV/2007/163 y fondos FEDER.

EFFECT OF CHOLESTEROL ADDITION TO BOAR SPERM MEMBRANES AND LENGTH OF STORAGE AT 16 °C PRIOR TO FREEZING ON SPERM CRYOSURVIVAL

ABSTRACT: Treating sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins (CLC) prior to freezing improved sperm cryosurvival in cold shock sensitive species. The resistance of boar sperm to cold shock could be increased by prolonging the holding time at 16°C before cooling. In this study, the effect of cholesterol addition to boar sperm and the effect that holding time (HT) at 16°C have on sperm quality after thawing were investigated. Sperm were frozen with lactose-egg yolk-glycerol extender. Each ejaculate was split in two aliquots with different HT at 16°C: 2h or 24h. The sample with HT of 2h was split in two sub-samples: control and CLC-treated before the HT. The sample with HT of 24h was split in three sub-samples: control, CLC-treated before HT 24h and CLC-treated 15 min before centrifugation. Treatment with CLC did not improve boar sperm quality after thawing. On the other hand, prolonging holding time at 16°C from 2h to 24h did not affect freezing results. However, these data are not conclusive and it would be necessary to check fertility and embryonic development in the future.

Keywords: boar sperm, cryopreservation, clc