

EFFECTO DE DISTINTOS CRIOPROTECTORES SOBRE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DEL SEMEN DESCONGELADO DE CONEJO

Talaván, A.M., Mocé, E. y Viudes de Castro, M.P.

CITA-IVIA. Polígono la Esperanza, nº 100, 12400. Segorbe (Castellón). España. E-mail: viudes_mar@gva.es

INTRODUCCIÓN

Los procesos de congelación y descongelación del semen inducen daños celulares que afectan a la capacidad fecundante del espermatozoide. En el caso del conejo, los resultados de fertilidad y prolificidad obtenidos con semen congelado están por debajo de los obtenidos con semen fresco. Es habitual el uso de sustancias como la leche descremada o la yema de huevo en los medios de congelación, sin embargo, uno de los retos a la hora de formular los medios de congelación es el de crear medios químicamente definidos en los que se eliminen los productos de origen animal, lo cual facilita la evaluación de las muestras (Vicente y Viudes de Castro, 1996; Kundu et al., 2002). La utilización de crioprotectores incrementa la protección de las membranas durante los procesos de crioconservación. En general, los medios de congelación de semen de conejo utilizan medios basados en el Tris, existiendo dos crioprotectores permeables que parecen ofrecer los mejores resultados, el dimetilsulfóxido (DMSO) y la acetamida (Mocé y Vicente, 2009). Pero los crioprotectores permeables pueden provocar daños en la membrana debido al choque osmótico que se produce en el momento de su adición, por lo que es conveniente utilizar además algún crioprotector no permeable. En distintos tipos celulares se ha testado el potencial crioprotector de diferentes polímeros y se ha observado que proporcionan una protección adicional cuando están presentes en el medio (Pellerín-Mendes et al., 1997; Kuleshova et al., 2001; Viudes de Castro et al., 2010).

El objetivo del presente trabajo fue, en primer lugar, estudiar el efecto sobre la calidad seminal de distintos medios de congelación, con DMSO y acetamida por separado así como en varias combinaciones, y en segundo lugar, evaluar el efecto que tenía en uno de los medios combinados con DMSO y acetamida la sustitución de esta última por un polímero sintético como el dextrano.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron mezclas heterospérmicas procedentes de 14 machos de origen neozelandés blanco alojados en la granja experimental del Centro de Investigación y Tecnología Animal de Segorbe. Sólo se utilizaron en las mezclas seminales aquellos eyaculados con valores superiores al 70% de motilidad y con menos del 15% de formas anormales o acrosomas dañados. El semen se diluyó a temperatura ambiente con el medio de congelación correspondiente (dilución 1:1; v:v), se envasó en pajuelas de 0,5 mL que se sellaron con PVA. Las pajuelas se introdujeron en una cámara a 5 °C donde permanecieron durante 45 minutos, tras lo cual se colocaron a 5 cm de la superficie del nitrógeno líquido, congelándolas en vapores de nitrógeno durante 10 minutos, antes de ser almacenadas en nitrógeno líquido. La descongelación se realizó en baño de agua a 50 °C durante 10 segundos. Los medios de congelación se prepararon utilizando como diluyente base el TCG (0,25 M de Tris [hidroximetil] aminometano, 88 mM de ácido cítrico anhidro, 47 mM de D(+) glucosa). En un primer experimento se utilizaron seis medios de congelación diferentes, dos medios controles, uno con DMSO, descrito por Vicente y Viudes de Castro (1996) y otro con 1,5 M de acetamida, y se combinaron ambos crioprotectores a distintas concentraciones, quedando de la siguiente manera: **A** (3,5 M DMSO+0,1 M sacarosa), **B** (1,5 M acetamida), **C** (3 M DMSO+0,1 M sacarosa+1,5M acetamida), **D** (3 M DMSO+0,1M sacarosa+1 M acetamida), **E** (2,5 M DMSO+0,1M sacarosa+1,5M acetamida), **F** (2,5 M DMSO+0,1 M sacarosa+1 M acetamida), y se emplearon seis mezclas heterospérmicas. En un segundo experimento, dado que no había diferencias entre los medios con ambos crioprotectores combinados, se tomó el medio de congelación con mayor concentración de DMSO y menor concentración de acetamida del experimento anterior (medio D) y se comparó con un medio en el que se sustituyó la presencia de acetamida por el dextrano (medio **G**: 3 M DMSO+0,1 M sacarosa+10% dextrano), utilizándose 9 mezclas heterospérmicas.

El porcentaje de motilidad total (espermatozoides móviles totales) y el de motilidad progresiva (espermatozoides progresivos/espermatozoides móviles) se evaluó mediante un

sistema computerizado de análisis de imagen (CASA, ISAS versión 1.0.17, Proiser, Valencia, España), para lo cual las muestras fueron diluidas con el diluyente TCG hasta una concentración de $7,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL en varios pasos (30×10^6 , 15×10^6 y $7,5 \times 10^6$), incubándose en un baño de agua a 37°C durante 10 minutos. Se analizaron 5 μL de cada muestra en una cámara Makler atemperada a 39°C y se examinaron un mínimo de 200 espermatozoides por muestra. El análisis del estado de los acrosomas y la viabilidad espermática se llevó a cabo mediante citometría de flujo con una tinción dual de ADN. Para cada muestra se tomó una alícuota de 100 μL de semen diluido (30×10^6 espermatozoides/mL) y se diluyó con 450 μL de TCG (concentración final $5,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL). Para el análisis de viabilidad se utilizaron SYBR-14 y yoduro de propidio y para ver el estado de los acrosomas se utilizaron FITC-PNA y yoduro de propidio. Las muestras fueron incubadas durante al menos 10 minutos a 22°C antes de ser analizadas. Para identificar las poblaciones espermáticas, sólo se seleccionaron aquellas que se teñían. A partir de los datos del citómetro se calcularon los porcentajes de: espermatozoides vivos (Viabilidad), espermatozoides totales con el acrosoma intacto (TAI) y espermatozoides vivos con acrosoma intacto (VAI).

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el paquete estadístico Statgraphics®Plus5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, USA). El efecto del medio de congelación sobre los parámetros de motilidad espermática, viabilidad e integridad del acrosoma fueron analizados mediante un análisis de la varianza. Los datos se presentan como medias mínimo cuadráticas \pm error estándar de la media.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los parámetros de calidad seminal del semen fresco y del semen congelado-descongelado del primer experimento se presentan en la Tabla 1. El semen fresco presentó una media de motilidad del 80,4% y un 28,3% de motilidad progresiva, obteniéndose un descenso considerable de la motilidad tras la congelación. No se observaron diferencias significativas entre los distintos medios de congelación utilizados, si bien, el medio A mostró siempre los mejores resultados de motilidad y el medio B los peores. No obstante, los valores de motilidad del semen congelado-descongelado obtenidos en el presente trabajo fueron menores que los observados por otros autores (Mocé et al., 2005; Viudes de Castro et al., 2005; Castellini et al., 2006; Kashiwazaki et al., 2006; Cortell y Viudes de Castro, 2008).

En los resultados de viabilidad espermática del semen congelado-descongelado se observaron diferencias significativas entre los distintos medios de congelación utilizados, presentando el medio B un porcentaje de espermatozoides vivos menor que el resto de los medios utilizados (Tabla 1), siendo menores que los obtenidos por otros autores (Kashiwazaki et al., 2006; Cortell y Viudes de Castro, 2008).

En lo que se refiere a la integridad del acrosoma, los valores medios obtenidos fueron de un 44%, siendo superiores a los observados por Kashiwazaki et al. (2006) con microscopía de fluorescencia. En el porcentaje de acrosomas intactos no se observaron diferencias significativas entre los distintos medios de congelación utilizados, mientras que el porcentaje de espermatozoides vivos que presentaban el acrosoma intacto sí se veía afectado por el medio de congelación, siendo el medio B el que mostraba valores significativamente menores ($14,38 \pm 2,44$ vs. $30,46 \pm 2,67$, $26,53 \pm 2,44$, $28,20 \pm 2,44$, $25,13 \pm 2,44$ y $29,35 \pm 2,44$ para los medios B vs. A, C, D, E y F, respectivamente, $P < 0,01$).

Los resultados de integridad acrosómica del segundo experimento se muestran en la Tabla 2. Podemos observar que los daños en el acrosoma obtenidos con ambos medios son similares. Mientras que el medio G (en el que se ha sustituido la acetamida por el dextrano) muestra un porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto significativamente superior al medio D, lo que coincide con los resultados de Kundu et al. (2002) en caprino.

Los resultados de este trabajo sugieren que un medio de congelación basado en el tris y con tan sólo acetamida como crioprotector no resulta conveniente para congelar semen de conejo, no obstante, cuando en el medio de congelación además de la acetamida, están presentes otros crioprotectores como el DMSO y la sacarosa, independientemente de la combinación utilizada, los resultados no difieren de los obtenidos con un medio control con DMSO y sacarosa exclusivamente. Por otra parte, cuando se sustituye la acetamida por dextrano, se observa un efecto estabilizador de membranas. Sería necesario realizar

estudios con medios de congelación con dextrano para ver cómo afecta la presencia de esta macromolécula a los resultados de fertilidad y prolificidad *in vivo*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

● Cortell, C., Viudes de Castro, M.P. 2008. *9th WRC. Verona-Italia*. ● Castellini, C., Pizzi, F., Theau-Clément, M., Lattaioli, P. 2006. *Theriogenology* 66: 2182-2187. ● Kashiwazaki, N., Okuda, Y., Seita, Y., Hisamatsu, S., Sonoki, S., Shino, M., Masaoka, T., Inomata, T. 2006. *J Reprod Dev* 52: 511-516. ● Kuleshova, L.L., Shaw, J.M., Trounson, A.O. 2001. *Cryobiology* 43: 21-31. ● Kundu, C.N., Chakraborty, J., Dutta, P., Bhattacharyya, D., Ghosh, A., Majumder, G.C. 2002. *Reproduction* 123: 907-913. ● Mocé, E., Lavara, R., Vicente, J.S. 2005. *Reprod Dom. Anim* 40: 516-521. ● Mocé, E., Vicente, J.S. 2009. *Anim Reprod Sci* 110: 1-24. ● Pellerin-Mendes, C., Million, L., Marchand-Arvier, M., Labrude, P., Vigneron, C. 1997. *Cryobiology* 35: 173-186. ● Vicente, J.S., Viudes de Castro, M.P. 1996. *Anim Reprod Sci* 44: 195-201. ● Viudes de Castro, M.P., Mocé, E., Vicente, J.S., Marco, F., Lavara, R. 2005. *Reprod Dom Anim* 40: 136-140. ● Viudes de Castro, M.P., Cortell, C., Vicente, J.S. 2010. *Theriogenology* 74: 1623-1628.

Agradecimientos: este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto RTA2010-00117-00-00 del INIA. A.M. Talaván ha sido financiada por una beca de formación del IVIA.

Tabla 1. Parámetros de calidad seminal para los distintos medios de congelación (n =6).

	Viabilidad (%)	TAI (%)	VAI (%)	Motilidad total (%)	% Motilidad Progresiva
Fresco	75,83 ± 2,05	87,95 ± 0,67	83,65 ± 1,19	80,39 ± 2,14	28,28 ± 2,83
A	17,34 ± 3,44a	48,86 ± 6,31	30,46 ± 2,67y	7,63 ± 1,93	3,20 ± 1,00
B	2,23 ± 3,14b	35,10 ± 5,76	14,38 ± 2,44z	1,83 ± 1,76	0,42 ± 0,91
C	15,08 ± 3,14a	45,02 ± 5,76	26,53 ± 2,44y	5,92 ± 1,76	2,33 ± 0,91
D	15,07 ± 3,14a	47,32 ± 5,76	28,20 ± 2,44y	5,00 ± 1,76	1,92 ± 0,91
E	11,92 ± 3,14a	42,63 ± 5,76	25,13 ± 2,44y	5,58 ± 1,76	1,75 ± 0,91
F	14,27 ± 3,14a	45,63 ± 5,76	29,35 ± 2,44y	5,75 ± 1,76	2,42 ± 0,91

TAI: porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto; VAI: porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto. a, b: valores con distinta letra en la misma columna difieren significativamente al 95% (P<0,05) y, z: valores con distinta letra en la misma columna difieren significativamente al 99%(P<0,01)

Tabla 2. Porcentaje de acrosomas intactos tras la descongelación (n = 9).

Medio de congelación	TAI (%)	VAI (%)
D	43,81 ± 2,81	28,70 ± 2,33a
G	48,81 ± 2,81	35,93 ± 2,33b

a, b: valores con distinta letra en la misma columna son significativamente diferentes (P<0,05)

EFFECT OF DIFFERENT CRYOPROTECTANS ON POST-THAWING RABBIT SPERM QUALITY PARAMETERS

ABSTRACT: The aim of this study was to assess the effects of different cryoprotectans on quality parameters of frozen-thawed rabbit semen. In the first experiment, six extenders tris-based were compared: A (3.5M DMSO+0.1M sucrose), B (1.5M acetamide), C (3M DMSO+0.1M sucrose +1.5M acetamide), D (3M DMSO+0.1M sucrose+1M acetamide, E (2.5M DMSO+0.1M sucrose+1.5M acetamide, F (2.5M DMSO+0.1M sucrose+1M acetamide). In a second experiment two extenders were compared: D and G (3M DMSO+0.1M sucrose+10% dextran). Motility was assessed using CASA and acrosomal integrity and viability were evaluated using flow cytometry. No significant differences were found between the six freezing extenders when motility was considered, while viability and acrosomal integrity were lower in the B medium than in the other extenders. The presence of dextran improved the percentage of live-acrosome intact sperm. However, it is necessary to evaluate the membrane stabilization effect of dextran on *in vivo* fertility and prolificacy.

Keywords: Sperm, cryopreservation, rabbit, dextran.