

REEVALUANDO DIFERENTES TEMPERATURAS DE DESCONGELACIÓN EN DOSIS DE SEMEN BOVINO

Muiño, R.¹ y Peña, A.I.¹

¹ Unidad de Reproducción y Obstetricia, Facultad de Veterinaria de Lugo (USC), 27002 Lugo. España. E-mail: rodrigomuino@colvet.es

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los estudios realizados para evaluar las diferentes temperaturas de descongelación en semen bovino, datan de los años 80. En esta época, para evaluar la motilidad total, la morfología y la integridad espermática se utilizaban tinciones simples sobre extensiones espermáticas y la motilidad total se valoraba de forma subjetiva. Actualmente, la citometría de flujo y los sistemas CASA (*computer assisted sperm analyzer*) permiten valorar características estructurales y funcionales de la célula espermática de forma objetiva y precisa. Con la citometría de flujo se pueden evaluar miles de células espermáticas por muestra, y obtener información sobre la viabilidad y supervivencia espermática con mayor precisión que utilizando la valoración visual bajo microscopio (Harrison et al., 1998). Además, los sistemas CASA permiten obtener información precisa sobre la proporción de espermatozoides móviles en una dosis seminal, así como conocer sus velocidades y trayectorias individuales; información que no puede ser obtenida al hacerlo de forma subjetiva (Holt, 1996).

La aplicación de actuales tecnologías para reevaluar algunos de los aspectos del protocolo de criopreservación, tal como, por ejemplo, utilizar temperaturas superiores a los 35 °C, podría permitir obtener información relevante, y de darse el caso, replantearse el protocolo de criopreservación bovino.

El objetivo del presente estudio fue evaluar dos temperaturas de descongelación más elevadas que la recomendada (35°C durante 40 segundos) para la descongelación de dosis seminales bovinas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se utilizaron 10 toros Holstein (1 eyaculados por toro) entre 15 y 24 meses de edad. Se evaluaron 18 dosis seminales de cada toro, 9 dosis para el experimento uno y 9 dosis para el experimento dos.

Tras la recogida seminal se tomó una alícuota de semen fresco, para una valoración inicial de los eyaculados, el resto del eyaculado se procesó con un diluyente comercial (Biladyl®, Minitüb Ibérica, Tarragona, España) el cual fue añadido en 2 pasos. El semen diluido fue envasado en pajuelas de 0,25 ml y congelado en vapores de nitrógeno líquido siguiendo una curva estandarizada para semen bovino (IMV® Digit-cool, IMV Technologies, Francia).

Nueve dosis de cada toro fueron descongeladas respectivamente siguiendo las siguientes temperaturas de descongelación: a) 35°C durante 40 segundos (estándar), b) 50°C durante 15 segundos, y c) 70 °C durante 5 segundos. La descongelación se hizo en un baño de agua a la temperatura adecuada. Inmediatamente después de la descongelación, el contenido de 3 pajuelas se depositó en un tubo falcon de 5 ml que contenía 250 µl de PBS. La solución espermática fue incubada a 37 °C post-descongelación.

Experimento 1: Se evaluó el efecto de las diferentes temperaturas de descongelación sobre la motilidad total (valorada subjetivamente) y sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal (utilizando el citómetro de flujo). El análisis espermático se realizó inmediatamente después de la descongelación y después de 5 horas de incubación a 37 °C. Para evaluar el daño plasmático y acrosomal se utilizó la triple tinción (Peña et al., 1999). Brevemente, se dispensaron 5 µl de yoduro de propidio (PI), 2 µl de lectina de cacahuete marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-PNA) y 20 µl de carboxy-SNARF1 en su forma acetoximetil éster (SNARF) que fueron añadidos a 200 µl de semen descongelado hasta alcanzar una concentración de 8×10^6 espermatozoides/ml, homogeneizado, e incubado a 37 °C en oscuridad durante 10 minutos. Después de la incubación la suspensión de semen teñido fue diluida con 300 µl de PBS a 37 °C y analizado en el citómetro (Epics XL flow cytometer, Coulter Corporation, Miami, FL, EEUU) que poseía un láser de argón de 15 mW con una longitud de onda de 488 nm.

Experimento 2: Al igual que en el experimento 1, se utilizaron 9 dosis seminales de cada toro que fueron descongeladas según las tres temperaturas de descongelación descritas. Luego, la motilidad espermática fue evaluada con un sistema CASA, para investigar la existencia de subpoblaciones espermáticas móviles en las muestras de semen descongelado y la influencia de las diferentes temperaturas de descongelación sobre la estructura de tales subpoblaciones. La evaluación se realizó inmediatamente después de la descongelación, y después de 2 horas de incubación a 37 °C. El estudio de subpoblaciones espermáticas con patrones de movimiento específico se realizó mediante un análisis de clusters multivariante, utilizando el procedimiento k-medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método de descongelación (35 °C/40 segundos; 50 °C/15 segundos; o 70 °C/8 segundos) no tuvo efecto significativo ni sobre la motilidad espermática, determinada subjetivamente o con un sistema CASA, ni sobre el porcentaje de espermatozoides vivos con el acrosoma intacto, en ninguna de las evaluaciones post-descongelación (Tabla 1). A diferencia de lo obtenido por otros autores (Senger 1980; Nur et al., 2003) que obtuvieron a temperaturas de descongelación superiores a 35°C, mejoría en la motilidad y la integridad acrosomal de las muestras descongeladas. Independientemente del método de descongelación, el tiempo de incubación causó una reducción significativa ($P < 0,001$) tanto de la motilidad (subjetiva o determinada con CASA) como de la viabilidad espermática.

Tras un análisis de clusters multivariante sobre un total de 6115 espermatozoides móviles, se identificaron cuatro subpoblaciones espermáticas con patrones de movimiento específicos.

El método de descongelación *per se* no tuvo influencia significativa sobre la distribución de los espermatozoides en las distintas subpoblaciones, sin embargo, la interacción entre método de descongelación y tiempo de incubación tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de espermatozoides asignado a la subpoblación 4.

En las muestras de semen descongeladas a 35 °C, la subpoblación 4 (subpoblación de espermatozoides muy rápidos y progresivos) se redujo de forma importante ($P = 0,017$) tras 2 h de incubación post-descongelación (24,1% a las 0 horas vs. 8,3% a las 2 horas); en cambio, esta subpoblación no varió de forma significativa cuando el semen fue descongelado a 50 °C (16,7% a las 0 horas vs 18,1% a las 2 horas) o a 70 °C (24,1% a las 0 horas vs 16,5% a las 2 horas). Las otras 3 subpoblaciones no se vieron influidas por la interacción entre el método de descongelación y el tiempo de incubación.

Para los tres métodos de descongelación, algunos de los parámetros cinéticos que definían a cada subpoblación, variaron de forma significativa durante las 2 horas de incubación post-descongelación. El cambio más interesante se observó en muestras descongeladas a 50 °C: los espermatozoides asignados a la subpoblación 4 mostraron un movimiento aún más rápido y progresivo tras 2 horas de incubación que justo tras la descongelación.

En resumen, cuando el semen se descongeló a las temperaturas más altas, la proporción de espermatozoides con movimiento rápido y progresivo fue mayor que cuando la descongelación fue a menor temperatura. Si esta pequeña diferencia podría afectar a la fertilidad *in vivo* del semen descongelado todavía se desconoce, pero lo que sí parece indicar es que la descongelación del semen a 35 °C es más perjudicial que a 50 °C o a 70 °C.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Harrison, R.A.P., Miller, N.G.A. 1998. Applying flow cytometry to the investigation of live sperm suspensions. *Proc BAS Advanced Topics in Andrology. Sperm Biology: New Techniques, New Insights*, pp. 1-3.
- Holt, W.V. 1996. Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. *Reprod Dom Anim* 31: 17-24.
- Nur, Z., Dogan, I., Soyulu, M.K., Ak, K. 2003. Effect of different thawing procedures on the quality of bull semen. *Revue Méd Vét* 154: 487-490.
- Peña, A., Johannisson, A., Linde-Forsberg, C. 1999. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology* 52: 965-980.

Senger, P.L. 1980. Handling frozen bovine semen-factors which influence viability and fertility. *Theriogenology* 13: 51-62.

Tabla 1. Porcentajes (medias±desviación estándar) de motilidad (determinada subjetivamente y mediante un sistema CASA) y de viabilidad espermática (determinada por citometría de flujo) en muestras de semen bovino con diferentes protocolos de descongelación (n=10).

Evaluaciones post-descongelación	Temperatura /tiempo de descongelación		
	35 °C/40 segundos	50 °C/15 segundos	70 °C/8 segundos
Motilidad Subjetiva 0 h	64,0±14,5	59,0±11,0	61,0±13,3
Motilidad Subjetiva 5 h	7,4±9,1	17,4±11,7	6,3±8,8
Motilidad CASA 0h	82,7±7,5	80,9±10,3	86,1±6,7
Motilidad CASA 2h	66,7±17,1	67,4±17,7	78,6±13,8
Viabilidad 0 h	73,4±15,0	73,3±13,3	74,4±7,7
Viabilidad 5 h	55,5±19,9	62,1±9,7	66,7±11,0

RE-ASSESSING DIFFERENT THAWING TEMPERATURES IN BULL SEMEN DOSES

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate three thawing rates for bull semen frozen in 0.25 ml-straws: placing straws in a water bath at 35 °C for 40 s, at 50 °C for 15 s or at 70°C for 5 s. In a first experiment, the 3 thawing rates were compared in relation to post-thaw sperm motility determined subjectively, and sperm plasma and acrosomal membrane integrity were examined by flow cytometry after 0 and 5 h of incubation at 37°C. In a second experiment, the three thawing rates were evaluated based on post-thaw sperm motility, determined using a CASA system, after 0 and 2 h of incubation at 37 °C. Then, the individual motility descriptors were analysed using a multivariate clustering procedure to test the presence of separate sperm subpopulations with specific motility characteristics. There were no significant differences between the 3 thawing methods on post-thaw motility or plasma and acrosomal sperm membrane integrity. The thawing rate had no significant influence on the frequency distribution of spermatozoa within the 4 subpopulations, but higher proportions of spermatozoa with fast and progressive movement were observed after post-thaw incubation when faster thawing rates were used.

Keywords: bovine, thawing rates, kinematic parameters, sperm subpopulations.