

RESPUESTA A UN ESTRÉS OXIDATIVO DE ESPERMATOZOIDES DE CAPRINO TRAS LA CONSERVACIÓN A 4°C DE DOSIS SEMINALES

Sadeghi¹, S., García-Colomer¹, B., Santolaria², P., Peris³, C., Pérez-Baena³, I., Gómez⁴, E.A., Yaniz², J. y Silvestre¹, M.A.

¹Universitat de València, ²Universidad de Zaragoza, ³Universitat Politècnica de València, ⁴Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias; miguel.silvestre@uv.es

INTRODUCCIÓN

La detección de machos infértiles es un parámetro muy importante para los centros de Inseminación Artificial o las explotaciones ganaderas. La movilidad espermática es uno de los parámetros más importantes y se correlaciona positivamente con la fertilidad. Sin embargo, no parece que un solo parámetro sea suficiente y el uso de modelos con múltiples parámetros es necesario para mejorar la predicción de la fertilidad o al menos para detectar los machos sub-fértiles (Yániz et al., 2018). Por otro lado, la citometría de flujo es una herramienta muy poderosa que nos permite evaluar diversos parámetros como viabilidad, despolarización de la membrana mitocondrial, fragmentación del ADN o peroxidación lipídica en miles de espermatozoides en un tiempo relativamente breve (Peña et al. 2018). Un nivel de oxidación excesiva de los espermatozoides estaría correlacionado negativa con la fertilidad (Chen et al., 2013). Sin embargo, recientemente, se ha observado en vacuno y equino, que la respuesta de los espermatozoides a la exposición de peróxido de hidrógeno (como factor oxidativo) estaba correlacionada positivamente con la fertilidad (r^2 : 0,24; Sellem et al., 2015, Barrier-Battut et al., 2016). El principio se basa en el hecho de que una oxidación moderada estaría implicada en el proceso de capacitación y su capacidad para fecundar (Sellem et al., 2015; Barrier-Battut et al., 2016). En caprino, no se ha estudiado como se comporta este parámetro y si tiene cierta relación con la fertilidad, o con otros parámetros más estudiados. Las pruebas de fertilidad in vivo tienen un coste elevado y se prolongan en el tiempo. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo consistirá en estudiar como afecta la conservación de las dosis seminales conservadas a 4°C a los parámetros de movilidad y la tasa de oxidación tras someterlos a un tratamiento de H₂O₂.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de semen: Los eyaculados se obtuvieron de 5 machos de la raza Murciano-Granadina mediante vagina artificial. Una vez en el laboratorio se evaluó la movilidad espermática y el estado de oxidación e integridad de membrana de los espermatozoides. Se conservaron a 4°C las muestras diluidas en medio compuesto por leche desnatada suplementado con glucosa durante 24 y 48h.

Movilidad espermática: Las muestras espermáticas se diluyeron en Tris-BSA-cítrico-glucosa a una concentración de 15-20 × 10⁶ spermatozoa/mL y se evaluó la movilidad utilizando el sistema CASA-mot (ISAS® v1.2, Proiser). Para este estudio se registró el % de espermatozoides móviles totales y de progresivos.

Oxidación y viabilidad de los espermatozoides (Sellem et al., 2015): El nivel de ROS intracelular se midió con el Easykit 3 (Ref. 025157; IMV Technologies). Unas muestras espermáticas incubaron en 200 µl de PBS en la placa con los fluorocromos durante 20 min a 37°C. Respuesta a un estrés oxidativo: Tras la incubación se suplementó con 2 µl de H₂O₂ a 39 mM y se incubó durante 10 minutos a 37°C, después se centrifugaron durante 5 minutos a 300 g, se resuspendió el pellet y se analizó el nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular. El nivel de ROS y la prueba de integridad de la membrana se evaluaron utilizando un citómetro de flujo BD LSRFortessa en el SCSIE (Universitat de València). Contiene 3 láseres: amarillo-verdoso 561 nm, amarillo 586/15 nm y verde 530/30 nm. Los resultados se expresaron en 4 grupos: espermatozoides con ROS elevada o no (ROS+ o ROS-), y espermatozoides con la membrana intacta o dañada (viables o no viables). Se evaluaron un mínimo de 3000 células / réplica y grupo.

Análisis estadísticos: Los resultados tanto de movilidad como el nivel de ROS se analizaron utilizando un GLM binomial con un modelo con 1 factor (tiempo de conservación a 5°C: 0h, 24h y 48h) (SPSS). Una probabilidad de p <0,01 se consideró estadísticamente diferente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como era de esperar, se observa un descenso en los parámetros de motilidad total de los espermatozoides conforme se incrementaba el tiempo de conservación refrigerada ya desde las primeras 24h (%Spz Mvl; Tabla 1). Sin embargo, los espermatozoides móviles conservan la progresividad durante más tiempo. También se observa de manera similar un descenso de la viabilidad a lo largo de la conservación refrigerado. Respecto al parámetro que queríamos estudiar, observamos que la disminución se producía de forma similar a la movilidad y a la viabilidad de los espermatozoides. Para distinguir el efecto del estrés oxidativo del descenso de la viabilidad, calculamos el % de los ROS+ sobre los espermatozoides viables observando que también que los espermatozoides viables frescos tenían valores más elevados de ROS+ que los espermatozoides viables conservados tanto a 24h como a 48h (83% vs. 67-58% para %Spz Vi-Ros+/vi a 0h y 24-48h de conservación; Tabla 1; $P < 0,01$). Es muy difícil encontrar un solo parámetro que explique suficiente variación de la fertilidad, lo habitual es encontrar un modelo con diversos parámetros implicados. Por lo tanto, el parámetro de respuesta a la oxidación puede ser un parámetro que nos dé información adicional a los parámetros que hasta la fecha se venían estudiando en espermatozoides de caprino. En futuros trabajos habría que estudiar su correlación con la fertilidad in vivo.

Tabla 1. Efecto de la conservación a 5°C sobre la movilidad total, progresiva, viabilidad y respuesta un estrés oxidativo en espermatozoides de caprino.

TIEMPO	%Spz Mvl	%Spz Progr	%Spz Progr/Mvl	%Spz Vi	%Spz Vi-Ros+	%Spz Vi-Ros+/vi
0 h	69 ± 0,8 ^a	65 ± 0,8 ^a	94 ± 0,5 ^a	72 ± 0,5 ^a	59 ± 0,3 ^a	83 ± 0,3 ^a
24 h	38 ± 0,9 ^b	35 ± 0,9 ^b	92 ± 0,8 ^a	48 ± 0,5 ^b	32 ± 0,3 ^b	67 ± 0,4 ^b
48 h	13 ± 0,6 ^c	11 ± 0,6 ^c	81 ± 2,1 ^b	29 ± 0,5 ^c	17 ± 0,2 ^c	58 ± 0,6 ^c

%Spz Mvl.: Tasa de espermatozoides móviles respecto al total. %Spz Progr.: Tasa de espermatozoides móviles respecto al total. %Spz Progr/Mvl: Tasa de espermatozoides progresivos respecto a los móviles. %Spz Vi: Tasa de espermatozoides viables respecto al total. %Spz Vi-Ros+: Tasa de espermatozoides viables con elevado ROS respecto a los totales. %Spz Vi-Ros+/vi: Tasa de espermatozoides viables con elevado ROS respecto a los viables

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barrier-Battut et al., 2016. Development of a new fertility prediction model for stallion semen, including flow cytometry. *Theriogenology* 86: 1447-1454.
- Chen et al., 2013. Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches. *Arch Gynecol Obstet* 288:191-199
- Peña et al. 2018. Flow cytometry analysis of spermatozoa: Is it time for flow spermetry?. *Reprod Domest Anim* 53 Suppl 2: 37-45.
- Sellem et al., 2015. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology* 84: 1447-1454.
- Yániz et al., 2018. CASA-Mot in mammals: an update. *Reprod Fertil Dev* 30:799-809.

Agradecimientos: Financiado por RTA2013-00107-C03-03 y AGL2017-85030-R.

RESPONSE TO OXIDATIVE STRESS OF GOAT SPERMATOZOA STORED AT 4°C

ABSTRACT: The detection of infertile males is a very important point for AI centers or livestock industries. Recently, it was observed in cattle and horses, that the response of spermatozoa to exposure of hydrogen peroxide was positively correlated with fertility. No information about this parameter was found in goat species. The objective of this work was to study the effect of the storage of goat seminal doses at 4°C on several parameters such as sperm motility and oxidation rate after submitting the sample to treatment with H₂O₂. It was observed viable sperm at 0h had higher ROS+ values than viable sperm preserved at both 24 and 48 h after exposure of hydrogen peroxide.

Keywords: oxidative stress, motility, spermatozoa, goat