

ESTUDIO DE LA CONGELACIÓN DE SEMEN OVINO: VARIACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE A TRAVÉS DEL PROCESO

J.I. Martí, E. Martí, T. Muiño-Blanco y J.A. Cebrián-Pérez
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Veterinaria
Universidad de Zaragoza

INTRODUCCIÓN

El éxito de la criopreservación de espermatozoides depende enormemente de la susceptibilidad de las células a las bajas temperaturas. Los espermatozoides de la especie ovina son especialmente sensibles al daño del frío, lo que se traduce en una enorme pérdida de capacidad fertilizante (Hammerstedt y cols., 1990; Salamon y Maxwell, 1995).

Además de daños en la membrana, la criopreservación induce la formación de especies oxígeno-reactivas que son perjudiciales para el espermatozoide (O'Flaherty y col., 1997). Asimismo, se ha confirmado que los niveles de las defensas antioxidantes disminuyen después del proceso de congelación/descongelación (Bilodeau y col., 2000).

El uso de diferentes aditivos en los diluyentes de criopreservación trata de reducir estos daños, existiendo un enorme número de posibilidades para las distintas especies. Los glicolípidos actúan controlando la fluidez de la membrana, protegiendo de esta forma de las transiciones de fase (Parks y Lynch, 1992). El efecto protector de antioxidantes, como la vitamina E, frente a las especies oxígeno-reactivas (ROS) se ha demostrado en la congelación de espermatozoides humanos (Sawetawan y col., 1993), bovinos (Beconi y col., 1993) y ovinos (Ollero y col., 1996). Diversas proteínas, como lactalbumina y seroalbumina, por su capacidad de unirse a diferentes lípidos, poseen un efecto crioprotector (Ollero y cols., 1996).

El objetivo de este trabajo es comprobar el efecto de diferentes aditivos sobre varios parámetros de calidad seminal y sobre varias enzimas del metabolismo oxidativo espermático, durante el proceso de congelación de espermatozoides ovinos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El diluyente utilizado se preparó a partir de leche descremada en polvo, a una concentración del 11% (p/v) en agua miliQ estéril. La fracción 1 se preparó añadiendo 5% de yema de huevo (v/v) y antibióticos (45.000 UI de penicilina y 0,4 g de estreptomicina/100 ml) a la leche reconstituida. Para preparar la fracción 2 se añadieron a la leche la misma cantidad de yema de huevo y de antibióticos, pero además 14% de glicerol (v/v) y galactosa 224 mM.

La rampa de descenso de la temperatura fue de 0,4°C/min, hasta los 5°C. La fracción 2 del diluyente se añadió a lo largo del proceso de equilibrado posterior. Tras el empajuelado se almacenaron en un contenedor con nitrógeno líquido a -196°C. Las muestras se descongelaron en un baño de agua a 60°C durante 4 segundos, y se procesaron seguidamente.

Los aditivos empleados fueron: vitamina E (1mM), ácido oleico-linoleico (25µM), α-Lactalbumina (11µM), β-Lactoglobulina (11µM), y proteínas del plasma seminal ovino (PPSO) (7 mg/ml). En cada experimento se congelaba una muestra control, con el diluyente sin ningún aditivo.

El plasma seminal se obtuvo mediante el protocolo de Ollero y cols. (1997). El filtrado obtenido se guardó hasta su uso a -20°C . Para obtener las proteínas seminales el filtrado descongelado se centrifugó a 3300 xg a 4°C en microconcentradores Microsep de 3 kDa de corte según Ollero y cols (1993). La concentración de las proteínas se determinó mediante el método de Bradford (1976).

La motilidad individual progresiva y el test de endósmosis (HOST) se evaluaron en microscopio de contraste de fases, empleándose para la motilidad una platina de 37°C . La viabilidad espermática se determinó mediante la tinción de fluorescencia con diacetato de carboxifluoresceína y yoduro de propidio (Harrison y Vickers, 1990).

El extracto enzimático se realizó mediante extracción con Tritón X-100 al 1% (v/v), analizándose la actividad de: GPx (glutación peroxidasa), GRD (glutación reductasa) y SOD (superóxido dismutasa). Las mezclas de reacción utilizadas fueron:
GPx.- 300 mM fosfato pH=7.2, 0.5 mM EDTA, 54 mU GRD, 85 mM NADPH + H^+ , 2 mM GSH y 1.2 mM t-BuO₂H (1.2 mM).

GRD.- 300 mM fosfato pH=7.2, 0.5 mM EDTA, 0.6 mM GSSG, y 85 mM NADPH + H^+ .

SOD.- 46 mM fosfato pH=7.8), 70 mM Xantina, 30 mM XTT y 0.15 mU Xantina oxidasa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los mayores valores de incremento respecto al control de los parámetros de calidad estudiados se obtuvieron con las proteínas del plasma seminal ovino. La α -Lactalbumina es la proteína que incrementa en menor medida los distintos parámetros, posiblemente porque ya esta presente en el propio diluyente. Las diferencias entre el resto de aditivos son menores, destacando únicamente una marcada mejora en el porcentaje de motilidad progresiva con ácido oleico-linolico (Figura 1).

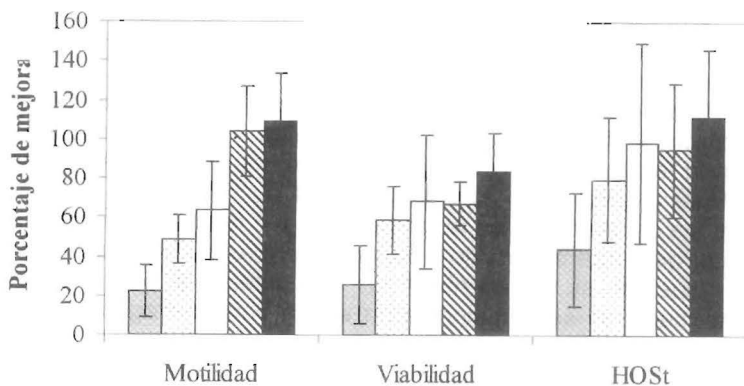


Figura 1.- Porcentaje de mejora en los distintos parámetros de calidad espermática respecto a la muestra control. □ α -Lactalbumina, ▨ Vitamina E, □ β -Lactoglobulina, ▨ ácido oleico-linolico, ■ PPSO.

En base a estos resultados, se ha comenzado a realizar la congelación combinando las proteínas del plasma seminal ovino con el resto de aditivos, con el objeto de aumentar los parámetros de calidad post-descongelación. Se ha realizado un estudio paralelo de varios enzimas del metabolismo oxidativo del espermatozoide. Se ha observado que durante el proceso de refrigeración disminuye la actividad de la GPx y de la SOD, enzimas que eliminan las ROS, y desaparece totalmente la actividad de la GRD, enzima que aporta el poder reductor necesario para la acción de la GPx.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Beconi, M.T., Francia, C.R., Mora, N.G. y Affranchino, M.A. (1993) Effect of Natural Antioxidants on Frozen Bovine Semen Preservation. *Theriogenology* **40**, 841-851.

Bilodeau, J.-F., Chatterjee, S., Sirard, M.-A. y Gagnon, C. (2000) Levels of antioxidant defenses after a cycle of freezing and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* **52**, 282-288.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Analyt. Biochem.* **72**, 248-254.

Hammerstedt, R.H., Graham, J.K. y Nolan, J.P. (1990) Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl.* **11**, 73-88.

Harrison, R.A.P. y Vickers, S.E. (1990) Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **88**, 343-352.

Ollero, M., García-López, N., Cebrián-Pérez, J.A. y Muño-Blanco, T. (1997) Surface changes of ram spermatozoa revealed adsorption of homologous and heterologous seminal plasma proteins revealed by partition in an aqueous two-phase system. *Reprod. Fert. Dev.* **9**, 381-390.

Ollero, M., Muño-Blanco, T., López-Pérez, M.J. y Cebrián-Pérez, J.A. (1996) Surface changes associated with ram sperm cryopreservation revealed by counter-current distribution in an aqueous two-phase system. Effect of different cryoprotectants. *J. Chrom. B* **680**, 157-164.

Ollero, M., Pascual, M., Muño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J. y López-Pérez, M. (1993) Surface changes associated with maturation of ram spermatozoa can be revealed by centrifugal counter-current distribution in an aqueous two-phase system. *J. Chrom. B* **668**, 173-178.

Parks, J.E. y Lynch, D.V. (1992) Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology* **29**, 255-266.

Salamon, S. y Maxwell, W.M.C. (1995) Frozen storage of ram semen. II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim. Reprod. Sci.* **38**, 1-36.

Sawetawan, C., Bruns, E.S. y Prins, G.S. (1993) Improvement of Post-Thaw Sperm Motility in Poor Quality Human Semen. *Fertil. Steril.* **60**, 706-710.

Watson, P.F. (1995) Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* **7**, 871-891.

Este trabajo ha sido financiado gracias a los proyectos DGA 48/99 AV y CICYT AGL 2000-1221. J.I. Martí disfruta de una beca M.E.C. asociada a A.N.G.R.A.