

## **EFFECTO DEL GM-CSF SOBRE LA CRIOCONSERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES OVINOS**

Flores E.<sup>1</sup>, Palomo M.J.<sup>1</sup>, Concha I.<sup>2</sup>, Rauch C.<sup>2</sup>, Rodriguez-Gil J.E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Reproducción Animal, Departamento de Medicina y Cirugía Animales, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Barcelona.

<sup>2</sup>Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Campus Isla Teja, Valdivia, Chile.

### **INTRODUCCIÓN**

El factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) es una citoquina capaz de estimular la proliferación, maduración y función de las células hematopoyéticas (Gasson, 1991). Estudios recientes han demostrado la presencia de receptores funcionales del GM-CSF en espermatozoides humanos y bovinos y su papel en el incremento del transporte de glucosa y vitamina C al interior de la célula (Zambrano y col., 2001). Este hecho, junto con la mejora observada en algunos de los parámetros de motilidad espermática tras la adición de este factor (Vilanova y col., 2003) sugieren que el GM-CSF podría tener un papel importante en la fisiología del espermatozoide.

Por otra parte, es ampliamente conocido que los espermatozoides de morueco son muy sensibles a los cambios extremos de temperatura (Salamon y Maxwell, 1995). De hecho, la crioconservación de espermatozoides ovinos se ha visto muy limitada en comparación con la de otros mamíferos domésticos, principalmente debido a que durante el proceso de congelación-descongelación, los espermatozoides ovinos sufren una dramática pérdida de heterogeneidad, viabilidad, motilidad y respuesta positiva al test de HOS (revisado por Curry, 2000). El objetivo del presente trabajo fue determinar si la adición del GM-CSF en el medio de congelación de espermatozoides de morueco podría mejorar las características seminales tras su descongelación.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se utilizaron 2 moruecos de raza Xisqueta de 2 años de edad aproximadamente y de peso y condición corporal similares, a los que se les extrajo semen 2 veces por semana durante su época reproductiva con ayuda de una vagina artificial. Tras la obtención del eyaculado, se determinó la motilidad masal y la concentración espermática con el fin de descartar aquellos que presentaban valores, para estos parámetros, extremadamente bajos. A continuación se tomó una primera alícuota diluida en el medio de congelación (Tris 1,82 g, glucosa 0,25 g, ácido cítrico 0,995 g, yema de huevo 7,5 ml, glicerol 2,5 ml y agua destilada hasta 50 ml) (Evans y Maxwell, 1987) para valorar diferentes parámetros de motilidad mediante S.C.A. (Microptic versión 5.1, Barcelona), otra para valorar la morfología y viabilidad de los espermatozoides mediante la tinción de eosina/nigrosina (Hancock, 1951) y una tercera para estudiar la integridad de la membrana plasmática mediante el test de endósmosis celular (HOST) descrito por Jeyendran y col. (1984), determinando el número de

espermatozoides que presentaban la cola enrollada tras la incubación en un medio hipoosmótico (150 mOsm.). Simultáneamente, el resto del eyaculado de cada macho se dividió en 2 partes, un grupo control que se diluyó con el medio de congelación y otro grupo diluido con este mismo medio al cual se le había añadido 5 nM de GM-CSF. Seguidamente se envasaron las muestras en pajuelas de 0,25 ml y se sometieron a un periodo de estabilización de 2 horas a 5 °C. Posteriormente, se procedió a la congelación depositando las pajuelas en una gradilla situada 3 cm por encima del nivel de nitrógeno líquido durante 8 minutos y transcurrido este tiempo se sumergieron en él. Para la descongelación se sometieron las pajuelas a 37 °C en un baño María durante 15 segundos y se analizaron los mismos parámetros que en el semen fresco (motilidad, viabilidad e integridad de la membrana plasmática). Los datos de viabilidad e integridad de la membrana plasmática obtenidos se analizaron mediante el análisis de la varianza incluyendo como factores el tratamiento, la fecha y el macho, utilizando el Modelo Lineal Generalizado (GLM) del programa estadístico SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Los datos de motilidad fueron analizados mediante ANOVA.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1. A pesar de ser todavía preliminares, se observaron diferencias significativas para la viabilidad y la integridad de la membrana plasmática cuando se comparó el semen fresco y el congelado con o sin GM-CSF. En cambio, no se pudieron apreciar diferencias significativas entre los dos tratamientos de congelación, control y con factor, aunque las estimas son ligeramente superiores en la congelación con GM-CSF.

Para la motilidad se estudiaron diversos parámetros como la motilidad total, la VCL (velocidad curvilínea), la VSL (velocidad rectilínea), la VAP (velocidad media), LIN (índice de linealidad), STR (índice de rectitud), WOB (índice de oscilación), ALHMed (amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza), ALHMax (amplitud máxima del desplazamiento lateral de la cabeza), DNC (*dance*), DNM (*dance* medio), AV (velocidad angular media), MADAbs (desplazamiento angular medio absoluto), BCF (frecuencia de batida de la cabeza), HLO (menor oscilación armónica de la cabeza), HHI (mayor oscilación armónica de la cabeza) y HME (oscilación media de la cabeza). Tras su análisis, se detectó el mismo efecto negativo de los tratamientos de congelación sobre casi todos los parámetros evaluados, excepto para la BCF y la HLO, donde el semen congelado con GM-CSF mostró valores que no difirieron significativamente del semen fresco. Al comparar los dos tratamientos de congelación, se observaron diferencias significativas en la motilidad total, LIN, STR, WOB, ALHMax y MADAbs, mejorando el tratamiento con GM-CSF dichos parámetros.

Estos resultados parecen indicar que el factor GM-CSF mejora algunos de los parámetros de calidad seminal como la motilidad total y el índice de linealidad de los espermatozoides ovinos, tal y como vieron otros investigadores en espermatozoides humanos y bovinos (Vilanova y col., 2003). Asimismo, otras características del movimiento espermático se han visto favorecidas con la adición de este factor en el medio de congelación, llegando incluso algunas de ellas a no diferir del semen fresco, anulando así algunos de los efectos negativos del proceso de crioconservación. Por lo

tanto, el GM-CSF podría utilizarse como uno de los factores implicados en la optimización de la crioconservación de semen de morueco.

**Tabla 1.** Efecto del GM-CSF en la congelación de semen de morueco para diferentes parámetros de calidad seminal.

PARÁMETRO	SEMEN FRESCO	DESCONGELADO CONTROL	DESCONGELADO CON GM-CSF
Viabilidad (%)	62,2 <sup>a</sup> ( $\pm$ 5,2)	25,0 <sup>b</sup> ( $\pm$ 5,2)	26,8 <sup>b</sup> ( $\pm$ 6,4)
HOST (%)	38,0 <sup>a</sup> ( $\pm$ 4,3)	6,7 <sup>b</sup> ( $\pm$ 2,3)	9,5 <sup>b</sup> ( $\pm$ 3,2)
Motilidad total (%)	80,9 <sup>a</sup> ( $\pm$ 1,5)	32,7 <sup>b</sup> ( $\pm$ 3,9)	48,2 <sup>c</sup> ( $\pm$ 4,0)
VCL ( $\mu$ m/sg)	79,7 <sup>a</sup> ( $\pm$ 2,4)	47,3 <sup>b</sup> ( $\pm$ 1,9)	49,9 <sup>b</sup> ( $\pm$ 1,6)
VSL ( $\mu$ m/sg)	46,2 <sup>a</sup> ( $\pm$ 4,1)	15,8 <sup>b</sup> ( $\pm$ 1,7)	16,3 <sup>b</sup> ( $\pm$ 1,3)
VAP ( $\mu$ m/sg)	58,6 <sup>a</sup> ( $\pm$ 2,7)	23,4 <sup>b</sup> ( $\pm$ 1,7)	24,4 <sup>b</sup> ( $\pm$ 1,6)
LIN (%)	62,6 <sup>a</sup> ( $\pm$ 2,0)	27,5 <sup>b</sup> ( $\pm$ 2,7)	31,9 <sup>c</sup> ( $\pm$ 1,4)
STR (%)	82,7 <sup>a</sup> ( $\pm$ 1,3)	52,0 <sup>b</sup> ( $\pm$ 4,3)	58,6 <sup>c</sup> ( $\pm$ 1,4)
WOB (%)	71,7 <sup>a</sup> ( $\pm$ 1,6)	45,5 <sup>b</sup> ( $\pm$ 1,8)	48,9 <sup>c</sup> ( $\pm$ 1,6)
Lamed ( $\mu$ m)	2,5 <sup>a</sup> ( $\pm$ 0,08)	2,1 <sup>b</sup> ( $\pm$ 0,08)	2,2 <sup>b</sup> ( $\pm$ 0,05)
ALHMax ( $\mu$ m)	6,4 <sup>a</sup> ( $\pm$ 0,2)	5,3 <sup>b</sup> ( $\pm$ 0,1)	5,6 <sup>c</sup> ( $\pm$ 0,1)
DNC ( $\mu$ m <sup>2</sup> /sg)	232,9 <sup>a</sup> ( $\pm$ 12,4)	129,3 <sup>b</sup> ( $\pm$ 8,8)	137,3 <sup>b</sup> ( $\pm$ 6,4)
DNM ( $\mu$ m <sup>2</sup> /sg)	0,07 <sup>a</sup> ( $\pm$ 0,00)	0,1 <sup>b</sup> ( $\pm$ 0,01)	0,1 <sup>b</sup> ( $\pm$ 0,01)
AV (grados angulares)	49,3 <sup>a</sup> ( $\pm$ 2,4)	19,7 <sup>b</sup> ( $\pm$ 1,2)	20,9 <sup>b</sup> ( $\pm$ 1,1)
MADAbs ( $\mu$ m)	57,8 <sup>a</sup> ( $\pm$ 2,8)	77,9 <sup>b</sup> ( $\pm$ 2,2)	71,8 <sup>c</sup> ( $\pm$ 0,6)
BCF (Hz)	15,4 <sup>a</sup> ( $\pm$ 0,3)	19,4 <sup>b</sup> ( $\pm$ 1,3)	15,3 <sup>a</sup> ( $\pm$ 0,2)
HLO ( $\mu$ m)	0,2 <sup>a</sup> ( $\pm$ 0,01)	0,1 <sup>b</sup> ( $\pm$ 0,02)	0,2 <sup>a</sup> ( $\pm$ 0,01)
HHI ( $\mu$ m)	2,6 <sup>a</sup> ( $\pm$ 0,1)	1,8 <sup>b</sup> ( $\pm$ 0,09)	1,8 <sup>b</sup> ( $\pm$ 0,1)
HME ( $\mu$ m)	1,1 <sup>a</sup> ( $\pm$ 0,04)	0,7 <sup>b</sup> ( $\pm$ 0,06)	0,7 <sup>b</sup> ( $\pm$ 0,05)

Resultados expresados como media ( $\pm$ EEM). Las medias con distinto superíndice difieren significativamente ( $P < 0,05$ ).

## BIBLIOGRAFÍA

- Curry MR. 2000. *Reviews of Reproduction*, 5:46-52.
- Evans G, Maxwell WMC. 1987. Salamon's Artificial Insemination of Sheeps and Goats. *Butterwoths*.
- Gasson JC. 1991. *Blood* 77:1131-1145.
- Hancock JL. 1951. *Nature*, 167:323-324.
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. 1984. *J. Reprod. Fert.*, 70:219-228.
- Salamon S, Maxwell WMC. 1995. *Anim. Reprod. Sci.* 37: 185-249.
- Vilanova LT, Rauch MC, Mansilla A, Zambrano A, Brito M, Werner E, Alfaro V, Cox JF, Concha I. 2003. *Theriogenology*, 60:1083-1095.
- Zambrano A, Noli C, Rauch MC, Werner E, Brito M, Amthauer R, Slebe JC, Vera JC, Concha I. 2001. *J. Cell. Biochem.*, 80:625-634.