

## EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD DURANTE EL PROCESO DE CRIOCONSERVACIÓN TRAS LA ADICIÓN O ELIMINACIÓN DE COLESTEROL DE LAS MEMBRANAS PLASMÁTICAS DE ESPERMATOZOIDES DE VERRACO

Tomás, C., Blanch, E., y Mocé, E<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> CITA-IVIA. Polígono de la Esperanza N° 100. Apartado de correos 187. 12400- Segorbe (Castellón). España. E-mail: moce\_eva@gva.es

### INTRODUCCIÓN

Durante el proceso de crioconservación, los espermatozoides sufren modificaciones que provocan una disminución de su calidad y, en consecuencia, una alteración de su funcionalidad (Holt, 2000). Estos cambios tienen lugar principalmente a nivel de la membrana plasmática, donde los fosfolípidos sufren un cambio de estado de líquido a gel, formando agregados lipídicos que dejan espacios a través de los cuales se facilita el paso de sustancias y se produce una redistribución de proteínas (Amann, 1999).

Las especies más resistentes al "cold shock" presentan un mayor ratio de colesterol: fosfolípidos en su membrana (Darin-Bennett y White, 1977). Además, los espermatozoides descongelados se encuentran en un estado muy similar a los espermatozoides capacitados en medios *in vitro*, donde se observa una pérdida de colesterol de la membrana plasmática, probablemente como mecanismo o señal de desencadenamiento de todo el proceso de capacitación y finalmente de la reacción acrosómica (Travis y Kopf, 2002).

A priori, si aumentase la cantidad de colesterol en las membranas plasmáticas de los espermatozoides antes de la congelación, éstos deberían ser más resistentes al descenso de temperatura y presentar mejores características post- descongelación. El colesterol puede añadirse a las membranas por medio de ciclodextrinas, que son capaces de transferirlo cuando han sido saturadas previamente de colesterol (Christian et al., 1997).

La adición de colesterol a las membranas de distintas especies con bajo ratio colesterol: fosfolípidos (toros, caballos, burros, moruecos y machos cabríos) previamente a la congelación mejora la calidad de los espermatozoides crioconservados (Combes et al., 2000; Morrier et al., 2004; Purdy y Graham, 2004; Barrera-Compean et al., 2005; Moore et al., 2005; Álvarez et al., 2006; Mocé y Graham, 2006; Torres et al., 2006; Tomás et al., 2008). Sin embargo, los resultados publicados en porcino son contradictorios (Zeng y Terada, 2000; 2001a; 2001b; Galantino-Homer et al., 2006). El objetivo de este estudio es evaluar la motilidad de los espermatozoides durante el proceso de crioconservación y si la adición de colesterol a la membrana plasmática de los espermatozoides puede mejorar su motilidad pre y post-descongelación.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los reactivos utilizados fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Madrid, España). En este estudio se han utilizado un total de 10 eyaculados recuperados de 4 verracos de raza Pietrain. La fracción rica de los eyaculados fue recuperada de forma manual y diluida 1:1 en una solución comercial de Beltsville Thawing Solution (BTS; Minitüb, Alemania). Las muestras se mantuvieron a 22 °C hasta su tratamiento. Para este trabajo se utilizó la Methyl- $\beta$ -ciclodextrina (MBCD) saturada previamente de colesterol (CLC) según el protocolo descrito por Purdy y Graham (2004) y se preparó una solución de trabajo (50 mg/mL) en BTS. Cada eyaculado fue dividido en tres alícuotas: control (C; no tratado), control negativo (N-1; tratado con 1 mg de MBCD/120 x 10<sup>6</sup> de espermatozoides) y tratado con CLC (CLC-1; tratado con 1 mg de CLC/120 x 10<sup>6</sup> de espermatozoides).

Tras la incubación durante 15 min a 22 °C con MBCD o CLC, las muestras fueron enfriadas hasta 16 °C durante dos horas y a continuación fueron crioconservadas según el método desarrollado por Westendorf et al. (1975). Una vez a 16 °C las muestras fueron centrifugadas (16°C, 800 g, 10 min), el sobrenadante eliminado y el pellet resuspendido en un medio de Lactosa-yema de huevo [LEY; 80% (v:v) de  $\beta$ -lactosa y 20% de yema de huevo] a una concentración final de 225 x 10<sup>6</sup> de espermatozoides/mL. A continuación, fueron enfriadas hasta 5 °C durante 2 h y diluidas (2:1; v:v) en un medio de LEY-Glicerol-

Orvus Es Paste [LEYGO; 89.5% de LEY + 9% de glicerol + 1.5% de Equex STM (Nova Chemical Sales Inc., Scituate, MA, USA)] a una concentración final de  $150 \times 10^6$  de espermatozoides/mL y 3% glycerol. Tras 15 min de equilibrado con el medio LEYGO, las muestras fueron envasadas en pajuelas de 0.5 mL (French Straws; Minitüb, Alemania) y congeladas a 4 cm sobre vapor de nitrógeno líquido durante 20 min en una caja de poliestireno expandido, antes de ser sumergidas en nitrógeno líquido.

Se tomaron alícuotas en 6 pasos del proceso para estudiar la evolución de la motilidad: 1) tras el tratamiento con MBCD o CLC; 2) después de la fase de enfriamiento hasta 16 °C; 3) tras la centrifugación; 4) después de la fase de enfriamiento hasta 5 °C; 5) transcurridos los 15 min de equilibrado con el medio LEYGO; 6) tras la descongelación (en un baño de agua a 37 °C durante 30 s). Las muestras fueron diluidas hasta una concentración de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL en BTS-BSA (6 mg/mL) se incubaron durante 10 min a 37 °C y se analizó la motilidad mediante un sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis System; ISAS version 1.0.17, Proiser; Valencia, España). Para cada análisis se depositaron 5  $\mu$ L de la muestra sobre una cámara Makler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) atemperada a 39 °C y se analizaron un mínimo de 200 células. Sólo el porcentaje de espermatozoides móviles totales (% MT) y móviles progresivos (% MP) fueron considerados en los resultados.

Los datos fueron analizados por un procedimiento MIXED (The SAS System for Windows 9.0) incluyendo la variable macho como efecto aleatorio y el tratamiento y momento del proceso de congelación como efectos fijos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo (Figura 1) demuestran que la motilidad de los espermatozoides durante el proceso de crioconservación se mantiene constante ( $P > 0,05$ ) hasta antes de la congelación (87-93 % MT y 71-78 % MP). Pero tras la descongelación se observa un descenso significativo (54-62 % MT y 50-56 % MP;  $P < 0,0001$ ) de la motilidad, independientemente del tratamiento recibido. Estos resultados son similares a los obtenidos por Cremades et al. 2005, donde las motilidades se mantuvieron constantes tanto en la fase de descenso a 17 °C como en la de descenso a 5 °C, pero disminuyeron de forma brusca tras la descongelación. En porcino Zeng y Terada (2000) obtuvieron mejores motilidades tras la descongelación en espermatozoides tratados previamente con ciclodextrinas sin saturar de colesterol (33 % vs. 57 %). Estas diferencias con respecto a nuestros resultados pueden ser debidas a diferencias en la concentración de yema de huevo utilizada (2 % vs. 20 %), ya que el efecto crioprotector de la yema de huevo podría enmascarar el efecto positivo o negativo de la adición o eliminación de colesterol de las membranas plasmáticas previamente a la congelación en nuestro trabajo.

En conclusión, la adición (CLC-1) o eliminación de colesterol (N-1) de la membrana plasmática, previamente a la congelación no mejora el porcentaje de espermatozoides móviles ni tras el descenso de temperatura a 5 °C (fase 4), ni tras la descongelación (fase 6), y por lo tanto no parece mejorar la calidad de los espermatozoides tras la descongelación. Sin embargo, son necesarias más pruebas para valorar la funcionalidad de estos espermatozoides y su capacidad fecundante.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, A. L., Serres, C., Torres, P., Crespo, F<sup>a</sup>., Mateos, E., Gómez-Cuétara, C. 2006. *Anim Reprod Sci.* 94: 89-91.
- Amman, R. P. 1999. *Encyclopedia of Reproduction* 1: 773-783.
- Barrera-Compean, M. H.. 2005. *J Anim Sci Suppl.* 1: 153
- Combes, G.B., Varner, D. D., Schroeder, E., Burghardt, R.C., Blanchard, T. L. 2000. *J Reprod Fertil Suppl.* 56: 127-132.
- Christian, A. E., Haynes M. P., Phillips, M. C., Rothblat, G. H. 1997. *J Lipid Res.* 38: 2264-2272.
- Cremades, T., Roca, J., Rodríguez-Martínez, H., Abaigar, T., Vázquez, J. M., Martínez, E. 2005. *J Androl.* 26: 610-618
- Darin-Bennett, A., White, I. G. 1977. *Cryobiology* 14: 466-470.
- Galantino-Homer, H. L., Zeng, W. X., Megee S. O., Dallmeyer, M., Voelkl, D., Dobrinski, I. 2006. *Mol Reprod Dev.* 73: 638-650.
- Holt, W. V. 2000. *Anim Reprod Sci.* 62: 3-

22. • Mocé, E., Graham, J. K. 2006. *J Anim Sci.* 84: 826-833. • Moore, A. I., Squires, E. L., Graham, J. K. 2005. *Cryobiology* 51: 241-249. • Morrier, A., Thériault, M., Castonguay, F., Bailey, J. 2004. *Proceedings of the Society for the study of reproduction meeting. Vancouver, Canadá.* P 239 Abstract 636. • Purdy, P. H., Graham, J. K. 2004. *Cryobiology* 48: 36-45. • Tomás, C., Blanch, E., Mocé, E. 2008. *Reprod Domest Anim.* 43: 53-53. • Torres, P., Serres, C., Gómez-Cuétara, C., Santiago, I., Mateos, E., Álvarez, A. L. 2006. • Travis, A. J., Kopf, G. S. 2002. *J Clin Invest.* 110: 731-736. *Anim Reprod Sci.* 94: 148-151. • Westendorf, P., Richter, L., Treu, H. 1975. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 82:261-267. • Zeng, W., Terada, T. 2000. *Reprod fertil dev.* 12: 223-228. • Zeng, W., Terada, T. 2001a. *Theriogenology* 55: 615-627. • Zeng, W., Terada, T. 2001b. *J Androl.* 22: 111-118.

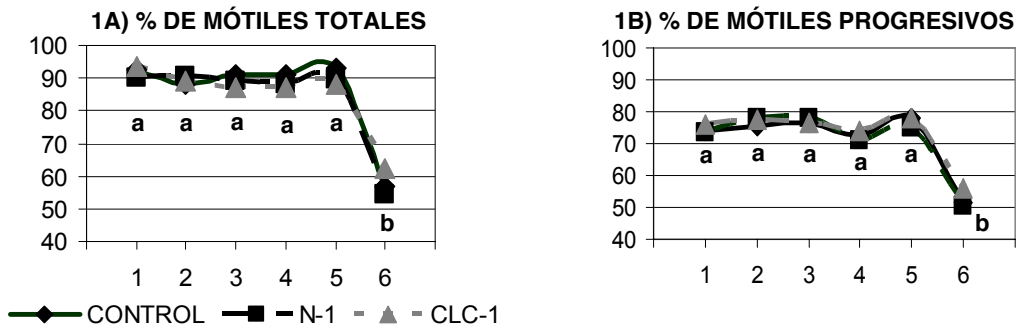


Figura 1: Evolución del % de espermatozoides móviles totales (1A) y % de espermatozoides móviles progresivos (1B) durante el proceso de crioconservación: 1) tras el tratamiento con MBCD o CLC; 2) después de la fase de enfriamiento hasta 16 °C; 3) tras la centrifugación; 4) después de la fase de enfriamiento hasta 5 °C; 5) transcurridos los 15 min de equilibrado con el medio LEYGO; 6) tras la descongelación. Los índices a y b indican diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ) entre pasos de la congelación.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por AGL2006-07769/GAN, GV/2007/163 y fondos FEDER.

### MOTILITY ANALYSIS DURING CRYOPRESERVATION OF BOAR SPERM ENRICHED IN OR DEPRIVED OF CHOLESTEROL

**ABSTRACT:** During cryopreservation spermatozoa suffer changes in their plasmatic membrane which cause a decrease in sperm quality and finally in their fertilizing ability. There are differences between species in their sperm cryoresistance. This is partly due to differences in plasma membrane composition, sperm from species cold-shock resistant present higher ratio cholesterol: phospholipids. In addition, after thawing sperm are in a state similar to capacitation, in which cholesterol is lost from the membrane. Increasing the cholesterol content of sperm plasma membrane could protect sperm during cryopreservation. The cholesterol can be added to plasmatic membrane by means of cholesterol-loaded cyclodextrin (CLC). With this technique, sperm cryosurvival increased in many domestic species, although results reported for boar sperm are contradictory. The objective in this study is to evaluate the motility during the cryopreservation process in boar sperm enriched in or deprived of cholesterol. The percentage of total motile spermatozoa (% TMS) and rapid progressive spermatozoa (% RPS) remained high until the equilibration with glycerol (87-93 % TMS; 71-78 % RPS) for all treatments. However, motility abruptly decreased after thawing (54-62 % TMS; 50-56 % RPS;  $P < 0.0001$ ), regardless of the treatment. In conclusion, neither cholesterol addition nor deprivation improves boar sperm quality after cryopreservation.

**Keywords:** Sperm, cryopreservation, methyl- $\beta$ -cyclodextrin, motility