

## RELACIÓN ENTRE LA CONGELABILIDAD DEL SEMEN DE VERRACOS Y LA RESISTENCIA AL CHOQUE TÉRMICO

De Mercado, E.<sup>2</sup>, Tomás, C.<sup>1</sup>, Blanch, E.<sup>1</sup>, Gómez-Fernández, J.<sup>2</sup>, Gómez-Izquierdo, E.<sup>2</sup> y Mocé, E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CITA-IVIA. Apdo. 187. 12400- Segorbe (Castellón). España. E-mail: moce\_eva@gva.es

<sup>2</sup> Centro de Pruebas de Porcino del ITACyL. Ctra. Riaza-Toro s/n, 40353 Hontalbilla (Segovia). España.

### INTRODUCCIÓN

El proceso de criopreservación provoca cambios muy importantes en el espermatozoide que afectarán a su calidad post-descongelación. Estas modificaciones son principalmente causadas por el estrés térmico y osmótico a los que son sometidos durante este proceso. Tradicionalmente, se ha clasificado a las especies en resistentes o sensibles a los choques térmicos, y esta sensibilidad al choque térmico de los espermatozoides se ha relacionado con la composición de su membrana plasmática (Parks y Lynch, 1992; Drobnis et al., 1993; Arav et al., 2000). Así, por la composición lipídica de su membrana plasmática, los espermatozoides de verracos han sido clasificados como muy sensibles a este fenómeno. Por otra parte, la resistencia de los espermatozoides al proceso de criopreservación también está relacionada con la composición de su membrana plasmática (Parks y Lynch, 1992), existiendo una gran variabilidad entre individuos. Ya que los espermatozoides son sometidos obligatoriamente al descenso de temperatura durante la criopreservación, la resistencia de los espermatozoides al choque térmico podría aportar información sobre la respuesta de los eyaculados al proceso de congelación. Si esto fuera así, este test de resistencia al choque térmico podría utilizarse en un futuro como un test para seleccionar los eyaculados aptos para criopreservar. El objetivo de este estudio fue determinar si puede existir alguna relación entre la resistencia de los espermatozoides al choque térmico y el proceso de congelación-descongelación.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Los reactivos utilizados fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Co., St. Louis, MO, EEUU), excepto el yoduro de propidio (PI) y el SYBR-14, que fueron adquiridos en Invitrogen (Corp., Carlsbad, EEUU). En este estudio se han utilizado un total de 8 eyaculados recuperados de diferentes verracos de raza Pietrain (Centro de Inseminación-CIAR, Peñaroya de Tastavins, Teruel). Las fracciones ricas de los eyaculados fueron recuperadas de forma manual, diluidas 1:1 en una solución comercial de Beltsville Thawing Solution (BTS; Minitüb Ibérica, La Selva del Camp, Tarragona, España) y transportadas a 16 °C hasta el laboratorio donde fueron procesadas. Todos los eyaculados procesados presentaron valores mínimos de 80% de espermatozoides vivos y 75% de espermatozoides móviles. De cada eyaculado se tomó una alícuota para el estudio del efecto del choque térmico en los espermatozoides, mientras que el resto del eyaculado fue criopreservado. Las alícuotas para choque térmico fueron diluidas a una concentración de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL en BTS a temperatura de 16 °C, envasadas en pajuelas de 0,25 mL para maximizar la superficie de contacto y acelerar el proceso de enfriamiento e introducidas en una cámara a 5 °C durante 10 minutos (min). La congelación se realizó siguiendo el protocolo desarrollado por Westendorf et al. (1975). Brevemente, las muestras fueron centrifugadas (16 °C, 800xg, 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  $1500 \times 10^6$  espermatozoides/mL. A continuación, el semen fue enfriado lentamente hasta 5 °C durante 2 h y después fue diluido (2:1; v:v) con diluyente LEY (89,5 %) suplementado con glicerol (9 %) y *Orvus Es Paste* (1,5%; Equex STM, Nova Chemical Sales Inc., Scituate, MA, EEUU), obteniendo una concentración final de  $1000 \times 10^6$  espermatozoides/mL y 3% glicerol. Tras 15 min de equilibrado con este diluyente, las muestras fueron envasadas en pajuelas de 0,5 mL (French Straws; Minitüb, Alemania) y congeladas en un biocongelador programable (Mini-Digitcool, IMV, Humeco, Huesca, España) siguiendo la curva de congelación descrita por Roca et al. (2003) antes de ser sumergidas en nitrógeno líquido para ser almacenadas

hasta su análisis. Las pajuelas se descongelaron en un baño de agua a 37 °C durante 30 segundos, y las muestras fueron diluidas a una concentración de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL con BTS-BSA (6 mg/mL).

En cada eyaculado, la concentración se evaluó en una alícuota fijada en una solución de PBS con glutaraldehído 0,25 % (dilución 1/100) con ayuda de una cámara de recuento celular (*Neubauer improved*). La calidad del movimiento espermático fue analizada 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 las muestras diluidas ( $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL) sobre una cámara Makler atemperada a 39 °C y se analizaron un mínimo de 200 células. La viabilidad de los espermatozoides fue analizada por citometría de flujo (Coulter EPICS XL-MCL; IZASA, Barcelona, España) mediante una doble tinción fluorescente de SYBR-14/PI, siguiendo el protocolo descrito por Purdy y Graham (2004). En las muestras sometidas a choque térmico y en las muestras criopreservadas se analizaron la movilidad y la integridad de la membrana plasmática (viabilidad). Se realizó un análisis de clasificación por clusters con el programa estadístico Statgraphics (Versión 15.2.12., StatPoint Technologies, Inc. Warrenton, Virginia, EEUU), para la separación de los eyaculados en dos grupos (buenos y malos congeladores), usando como variables discriminantes el porcentaje de espermatozoides móviles totales y el porcentaje de espermatozoides vivos tras la descongelación. Las diferencias entre las variables de calidad del choque térmico entre grupos de congelación fueron contrastadas mediante un análisis GLM con el paquete estadístico SAS (Version 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, EEUU).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los parámetros de calidad del semen congelado-descongelado de los machos buenos y malos congeladores se encuentran en la Tabla 1. Esta clasificación obtenida por el análisis por clusters se utilizó para determinar el efecto del choque térmico en machos catalogados como buenos o malos congeladores. Según Watson (1995), uno de los signos más evidentes de daño causado por choque térmico es la pérdida irreversible de movilidad, seguida por la lesión de las membranas plasmática y acrosomal. En nuestro trabajo, el porcentaje de espermatozoides móviles totales fue estadísticamente diferente entre los machos buenos y malos congeladores tras ser sometidos a choque térmico, mientras que el resto de parámetros fue similar entre los dos grupos (Tabla 2). De acuerdo con nuestros resultados, parece que pueda existir una relación entre el porcentaje de espermatozoides móviles totales tras ser éstos sometidos al choque térmico y el porcentaje de espermatozoides móviles totales tras la descongelación, aunque esto debería ser estudiado en profundidad en futuros trabajos. Las diferencias entre machos individuales a la resistencia al choque térmico y al proceso de criopreservación ha sido asociada a diferencias en la composición de la membrana plasmática (Parks y Lynch, 1992), aunque existe controversia entre trabajos (Cerolini et al., 2001). En nuestro trabajo se observa una disminución drástica en el porcentaje de espermatozoides móviles tras la congelación en algunos machos, mientras que la integridad de la membrana plasmática no se ve tan afectada. Esta diferencia entre estos dos parámetros de calidad espermática podría ser debida a un aumento de la concentración de calcio intracelular. Así, se ha observado que durante el descenso de temperatura los espermatozoides captan calcio del medio a su interior, y este aumento en los niveles de calcio intracelular puede causar un daño en la célula y una consecuente pérdida de la motilidad sin que la membrana se vea afectada (White, 1993). No obstante, para confirmar esta hipótesis sería necesario realizar más investigaciones con un mayor número de machos y estudiar si los machos en los que se observa una pérdida de movilidad tras la descongelación presentan mayores niveles de calcio intracelular que los machos en los que no se observa una pérdida del porcentaje de espermatozoides móviles tan acusada. En conclusión, los verracos que presentaron menor porcentaje de espermatozoides móviles tras la descongelación presentaron también menor capacidad de resistencia al choque térmico (porcentaje de espermatozoides móviles). No obstante, la utilidad de este test de resistencia al choque térmico como posible predictor de la calidad del semen post-descongelación debería ser estudiada en futuros trabajos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arav, A., Pearl, M. & Zeron, Y. 2000. *Cryo. Letters* 21: 179-186 • Cerolini, S., Maldjian, A., Pizzi, F. & Gliozzi, T.M. 2001. *Reproduction* 121: 395-401. • Drobniš, .EZ., Crowe, L.M., Berger, T., Anchoroguy, T.J., Overstreet, J.W. & Crowe, J.H. 1993. *J. Exp. Zool.* 265: 432-437. • Parks, J.E., & Lynch, J.V. 1992. *Cryobiology* 29: 255-266. • Purdy, P.H. & Graham, J.K. 2004. *Cryobiology* 48: 36-45. • Roca, J., Carvajal, G., Lucas, X.M., Vázquez, J.M. & Martínez E.A. 2003. *Theriogenology* 57: 385. • Watson, P.F. 1995. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 871-891. • Westendorf, P., Richter, L., Treu, H. 1975. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 82: 261-267. • White, I.G. 1993. *Reprod. Fertil. Develop.* 5: 639-658.

**Agradecimientos:** a CIAR (Peñarroya de Tastavins, Teruel) por proporcionarnos los eyaculados. Este trabajo ha sido financiado por AGL2006-07769/GAN, GV/2007/163 y fondos FEDER. Agradecemos la financiación del MICINN (C. Tomás, FPI Ref. BES-2007-17063; Madrid), CAPA (E. Blanch, CAPA, DOGV5324; Valencia) e INIA-CCAA cofinanciado por el Fondo Social Europeo (E. Mocé). E. Mocé está en la actualidad contratada mediante fondos del Subprograma Ramón y Cajal del MICINN (ref. RYC-2010-06162; Madrid).

**Tabla 1.** Clasificación por clusters de los eyaculados de verraco en dos grupos (buenos y malos congeladores), según el porcentaje de espermatozoides vivos y móviles totales (MT) tras la descongelación.

Grupo	N	MT (%)	Vivos (%)
Buenos	5	47,90	63,61
Malos	3	12,03	46,11

**Tabla 2.** Calidad del semen de verracos buenos o malos congeladores tras el choque térmico. Los resultados se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media.

Grupo	Vivos (%)	MT(%)	Móviles progresivos (%)
Buenos	81,88 $\pm$ 2,19	74,96 $\pm$ 4,49 <sup>a</sup>	33,42 $\pm$ 8,87
Malos	81,71 $\pm$ 2,82	55,57 $\pm$ 5,80 <sup>b</sup>	32,13 $\pm$ 11,45

<sup>a, b</sup>: indican diferencias significativas entre grupos de congelación ( $P < 0,05$ ).

## RELATIONSHIP BETWEEN BOAR SPERM FREEZING ABILITY AND COLD SHOCK RESISTANCE

**ABSTRACT:** Sperm cryopreservation involves major changes that will affect negatively the sperm quality obtained after thawing. These changes are mainly due to thermal and osmotic stress. Susceptibility of sperm to chilling injury has been related to the sperm membrane composition. The aim of this study was to determine whether individuals with greater resistance to freezing and thawing process may present also greater resistance to cold shock as a first step to develop a test to select the ejaculates worth of being cryopreserved. The cluster analysis classification according to the values of percentage of total motile sperm after thawing split ejaculates of different males into two groups ("good" and "bad freezers"). When these groups were used to evaluate the sperm quality after ejaculates were subjected to cold shock, we observed that sperm from males classified as "good freezers" exhibited also higher percentages of total motile sperm (74.96 $\pm$ 4.49%) than the sperm from "bad freezers" (55.57 $\pm$ 5.80%). According to our results, the sperm response to cold shock (in terms of total motile sperm) could have a relationship with the percentage of total motile sperm obtained after thawing, although the sperm membrane integrity does not seem to be involved. Nevertheless, further studies are needed to assess the usefulness of this cold shock resistance test as a possible predictor of sperm quality after cryopreservation.

**Keywords:** sperm, cryopreservation, cold shock, motility.