

## ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LA MEMBRANA DEL ESPERMATOZOIDE DE CERDO IBÉRICO Y SU POSIBLE RELACIÓN CON LA RESISTENCIA AL PROCESO DE CRIOCONSERVACIÓN

De Mercado<sup>1</sup>, E., Tomás<sup>2</sup>, C., Gómez-Fernández<sup>1</sup>, J., Gómez-Izquierdo<sup>1</sup>, E., Carrasco<sup>3</sup>, J.A. González-Bulnes<sup>4</sup>, A., Sánchez-Sánchez<sup>4</sup>, R.

<sup>1</sup>Centro de Pruebas de Porcino del ITACyL. Ctra. Riaza-Toro s/n, 40353 Hontalbilla (Segovia). España. <sup>2</sup>Centro de Investigación y Tecnología Animal (CITA-IVIA), Segorbe (Castellón). España. <sup>3</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición ICTAN-CSIC) <sup>4</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA). Madrid. España. E-mail: [ita-merpened@itacyl.es](mailto:ita-merpened@itacyl.es)

### INTRODUCCIÓN

Las membranas celulares sufren daños durante el proceso de crioconservación y la reversibilidad de estos daños varía con la composición de dicha membrana (Quinn, 1989). En el proceso de crioconservación espermática se altera la fluidez de distintos dominios lipídicos en la membrana de la cabeza del espermatozoide (Buhr, 1991) cambiando su composición y dinámica (Pettitt y Buhr, 1998).

Las diferencias en la composición lipídica de la membrana plasmática del espermatozoide se consideran como un factor clave en su resistencia al proceso de congelación (Parks y Lynch, 1992; White, 1993). En muchas especies de mamíferos, más del 60% del total de los ácidos grasos de la membrana espermática son ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Bannon et al., 1985; Bennet et al., 1987). La presencia de estos ácidos grasos confiere una mayor fluidez a la membrana, por la presencia de sus dobles enlaces (Bradford, 1976; Yeagle, 1992), que podría estar implicada en una mayor resistencia al daño por formación de cristales de hielo durante el proceso de crioconservación (Madjian et al., 2005; Waterhouse et al., 2006).

El objetivo de este estudio fue determinar si la composición en ácidos grasos de la membrana del espermatozoide de cerdo Ibérico pudiera presentar una relación con su resistencia al proceso de crioconservación.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se utilizaron 37 eyaculados de diferentes verracos procedentes de estirpes distintas de cerdo Ibérico. De cada eyaculado se recogieron 2 alícuotas, una para la extracción de los ácidos grasos de la membrana del espermatozoide, y otra para la congelación y posterior clasificación en función de su calidad post-descongelación.

Para la determinación de los ácidos grasos, se separó el plasma seminal de los espermatozoides por centrifugación a 1000g durante 20 min a 4°C y 2 lavados en una solución de cloruro sódico (9 g/L), para posteriormente realizar la extracción de los lípidos usando el método de Folch et al. (1956), modificado para el análisis mediante espectrometría de masas. Para la determinación de la congelabilidad de los eyaculados, éstos fueron congelados y evaluados post-descongelación para su clasificación. El método de congelación utilizado se basó en el procedimiento descrito originalmente para pajuelas de 5 mL por Westendorf et al. (1975) y posteriormente adaptado para pajuelas de 0,5 mL (Thurston et al. 1999 y Carvajal et al., 2004) utilizando el medio de congelación fructosayema de huevo (Thilmant, 1997; FAO, 1998).

Las muestras fueron descongeladas en un baño de agua a 37 °C durante 20 segundos y diluidas 1:1 en diluyente Beltsville Thawing Solution (BTS; Minitüb Ibérica, La Selva del Camp, Tarragona, España). Pasados 30 minutos de incubación, se analizó el porcentaje de espermatozoides móviles totales (% MT), mediante el sistema SCA (Sperm Class Analyzer® Microptic, Barcelona, España), así como el porcentaje de espermatozoides vivos totales (% VT), mediante una doble tinción fluorescente con yoduro de propidio (espermatozoides con membrana dañada/muertos) y SYBR-14 (espermatozoides con membrana intacta/vivos), un mínimo de 200 células fueron contadas a 400x usando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400, Tokyo, Japon) equipado con un filtro de excitación/barrera Nikon G-2A de 510/590.

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 en 2 grupos de los distintos eyaculados (buenos y malos congeladores), usando

como variables discriminantes el % MT y el % VT, tras 30 minutos de incubación a 37 °C. Las diferencias en la proporción de ácidos grasos en la membrana espermática 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

En este estudio se trató de determinar si la composición en ácidos grasos de las membranas espermáticas de cerdo Ibérico podría ser un indicativo de la congelabilidad espermática, ya que la composición lipídica de la membrana puede afectar parcialmente a la supervivencia criogénica del semen (De Leeuw, 1991; Parks y Lynch, 1992).

Aunque los resultados obtenidos muestran una clara diferencia entre los 2 grupos de congelabilidad en función de su calidad post-descongelación tanto en el % VT (Buenos: 55,9%; Malos: 41,2%;  $P < 0,05$ , Error Estándar de la Media (EEM): 2,16), como en el % MT (Buenos: 51,8%; Malos: 28,9%;  $P < 0,05$ , EEM: 2,71), no se observan diferencias significativas en cuanto a la composición de ácidos grasos de las membranas entre grupos de buenos y malos congeladores (Tabla 1, 2 y 3,  $P > 0,05$ ). Este hecho contradice lo obtenido por White (1993), que determinó que la resistencia al choque por frío estaba relacionada con altos niveles de esteroides en la membrana y un bajo ratio de ácidos grasos insaturados/saturados, que aumentan la temperatura a la cual tiene lugar la transición de fase líquido-gel y por tanto mejoran la protección en el proceso de crioconservación. Sin embargo, otros autores (Cerolini et al., 2001; Waterhouse et al., 2006; Madjan et al., 2005) han puesto de manifiesto resultados similares a los obtenidos en este ensayo en cerdo blanco, así como en otras especies de animales domésticos (Miller et al., 2004).

En resumen, según este estudio en los espermatozoides de cerdo Ibérico no parece existir una relación entre la composición de su membrana plasmática en ácidos grasos y su resistencia al proceso de crioconservación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bannon, J.C.D., Craske, J.D., Hilliker, J.A.E. 1985. *J Am Oil Chem Soc* 62: 1501-1507.
- Bennet, P.J., Moatti, J.P., Mansat, A., Ribbes, H., Cayrac, J.C. Pontonnier, F., Chap, H., Douste-Blazy, L. 1987. *Biochim Biophys Acta* 919: 255-265.
- Buhr, M.M., Fiser, P., Bailey, J.L., Curtis, E.F. 2001. *J Androl* 22: 961-969.
- Bradford, M. 1976. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Carvajal, G., Cuello, C., Ruiz, M., Vázquez, J.M., Martínez, E.A., Roca, J. 2004. *J Androl* 25: 389-396.
- Cerolini, S., Maldjian, A., Pizzi, F. & Gliozzi, T.M. 2001. *Reproduction*. 121: 395-401.
- De Leeuw, F.E., Colenbrander, B., Verkleij, A.J. 1991. *Reprod Dom Anim* 1: 95-104.
- FAO, 1998. *FAO Publications, Rome*.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H. 1956. *J Biol Chem* 497-509.
- Madjian, A., Pizza, F., Gliozzi, T. Cerolini, S., Penny, P., Noble, R. 2005. *Theriogenology* 63: 411-421.
- Miller, R.R.Jr., Sheffer, C.J., Cornett, C.L., McClean, R., MacCallum, C., Johnston, S.D. 2004. *Cryobiology* 49 137-148.
- Parks, J.E., Lynch, J.V. 1992. *Cryobiology* 29: 255-266.
- Pettiitt, M.J., Buhr, M.M. 1998. *J Androl* 19: 736-746.
- Quinn, P.J. 1989. *J Bioenerg Biomembr* 21: 3-19.
- Thilmant, P. 1997. *Ann Med Vet* 141: 457-462.
- Thurston, L.M., Watson, P.F., Holt, W.V. 1999. *Cryobiology* 39: 335.
- Waterhouse, K.E., Hofmo, P.O., Tverdal, A., Miller Jr, R.R. 2006. *Reproduction* 131: 887-894.
- Westendorf, P., Richter, L., Treu, H. 1975. *Wochenschr* 82: 261-267.
- White, I.G. 1993. *Reprod Fertil Develop* 5: 639-658.
- Yeagle, P.L. 1992. pp. 603-651. CRC Press, Boca Raton, FL.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PEP 2006/1273.

**Tabla 1.** Porcentaje de ácidos grasos saturados en la membrana de los espermatozoides de buenos y malos congeladores.

Grupo	C14:0	C15:0	C16:0	C17:0	C18:0	C20:0
Buenos	12,88	0,23	25,46	0,26	15,27	0,75
Malos	12,07	0,24	25,9	0,24	16,5	0,89
EEM	0,805	0,016	0,42	0,012	0,47	0,06
P-Valor	0,48	0,93	0,47	0,21	0,079	0,1

**Tabla 2.** Porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados en la membrana de los espermatozoides de buenos y malos congeladores.

Grupo	C16:1	C18:1	C20:1
Buenos	0,62	5,94	0,18
Malos	0,65	6,75	0,2
EEM	0,03	0,38	0,008
P-Valor	0,48	0,15	0,06

**Tabla 3.** Porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana de los espermatozoides de buenos y malos congeladores.

Grupo	C18:2 (n6)	C18:3 (n3)	C20:2 (n6)	C20:3 (n3)	C20:4 (n6)	C20:5 (EPA)	C22:5 (DPA)	C22:6 (DHA)
Buenos	3,05	0,05	0,82	2,67	3,53	0,25	0,51	25,57
Malos	3,26	0,06	0,7	2,34	3,51	0,19	0,42	24,99
EEM	0,15	0,007	0,06	0,14	0,11	0,025	0,07	1,42
P-Valor	0,34	0,26	0,21	0,12	0,91	0,12	0,41	0,77

**Tabla 4.** Porcentaje total de ácidos grasos saturados, insaturados, monoinsaturados, poliinsaturados y ratio insaturados/saturados en la membrana de los espermatozoides de buenos y malos congeladores.

Grupo	Saturados	Insaturados	Monoinsaturados	Poliinsaturados	Ratio insaturados/saturados
Buenos	56,3	43,7	6,52	37,18	0,79
Malos	56,9	43,09	7,23	35,86	0,77
EEM	1,17	1,17	0,85	1,16	0,2
P-Valor	0,72	0,72	0,33	0,43	0,72

#### STUDY OF THE FATTY ACID COMPOSITION OF THE IBERIAN PIG'S SPERM MEMBRANE, AND ITS POTENTIAL RELATIONSHIP WITH RESISTANCE TO THE CRYOPRESERVATION PROCESS

**ABSTRACT:** The cryopreservation process causes damage to the sperm plasmatic membrane altering its fluidity and becoming more stiff and susceptible to breakage. The composition of the membrane seems to be a key factor in the resistance of sperm to this process. It is known that there are individual differences with regard to sperm resistance to freezing process, and these differences could be due to different fatty acid composition in plasmatic membrane. The aim of this study was to determine if fatty acid composition of the Iberian pig's sperm membrane could have a potential relationship with their resistance to freezing process. The results indicated that there were significant differences in post-thaw quality among different males in percentage of total live sperm (Good freezers: 55.9%; Bad freezers: 41.2%,  $P < 0.05$ ) and percentage of total motile sperm (Good freezers: 51.8%; Bad freezers: 28.9%  $P < 0.05$ ) but there were no differences between groups in their fatty acid composition (saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids). We can conclude that the fatty acid composition of the sperm membrane does not affect sperm freezability of Iberian pig.

**Keywords:** Iberian pig, sperm, freezability, fatty acids.