

DAÑOS EN EL ACROSOMA DEL ESPERMATOZOIDE POR EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN EN CERDOS DE RAZAS COMERCIALES

María Guadalupe Orozco¹, C. Lemus¹, C.A. González¹, C. Morleo¹, R. Navarrete¹, M.J. Acosta², Madelyn Rueda² y J.A. Hernández¹

¹ Universidad Autónoma de Nayarit. Ciudad de la Cultura "Amado Nervo", Tepic. Nayarit, México
email: mgorozco63@gmail.com y clemus@nayar.uan.mx

² Instituto de Investigaciones Porcinas. Gaveta Postal No. 1, Punta Brava. La Habana, Cuba

RESUMEN

Se evaluaron los daños que experimenta el acrosoma del espermatozoide por la criopreservación en tres razas de cerdos. Se utilizó un semental de cada raza comercial (Yorkshire, Landrace y Duroc). Se obtuvieron tres eyaculados, de manera alterna y se evaluaron en fresco y descongelado. Sólo se congelaron eyaculados con más del 80% de motilidad, menos del 15% de morfoanomalías, y una concentración espermática de 300×10^6 por mL. Para la congelación se utilizó el método de Westendorf. La evaluación del acrosoma se realizó con la técnica de triple tinción, se contaron 100 espermatozoides/muestra con microscopio óptico con el objetivo de 100X. El diseño utilizado fue completamente al azar con submuestreo.

El cambio de temperatura de fresco a descongelado provocó daños en las membranas de los espermatozoides. Los daños ocasionaron una disminución significativa ($P < 0.05$) en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto, en el semen descongelado. El porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto disminuyó en la razas; Yorkshire, Landrace y Duroc: 40.76, 45.50 y 46.04 % respectivamente. En la raza Yorkshire, se observó un aumento significativo ($P < 0.05$) en el porcentaje de espermatozoides vivos sin acrosoma (6.40 %). En semen descongelado, la raza Yorkshire mostró el mayor porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto, después la raza Landrace y con el menor porcentaje la raza Duroc.

El proceso de criopreservación provoca daños en las membranas espermáticas y pérdida del acrosoma en los espermatozoides criopreservados.

Palabras claves: acrosoma, espermatozoide, cerdos, genotipo, criopreservación

Título corto: Criopreservación y daños en el acrosoma de cerdos

DAMAGE IN SPERMATOOA ACROSOMA DURING CRYOPRESERVATION IN PIGS OF COMMERCIAL BREEDS

SUMMARY

This work was carried out to assess the acrosome damage of spermatozoa for the cryopreservation process in three breeds of pigs. A commercial boar of each breed (Yorkshire, Landrace and Duroc), was used. Three ejaculates were obtained, alternately and examined in fresh and thawed. Only ejaculates with more than 80% motility, less than 15% of morphoanomalies, and a concentration of 300×10^6 spermatozoa/mL, were frozen. For freezing the Westendorf method was used. Acrosome assessment was performed with triple staining technique, 100 spermatozoa were counted for every sample by optical microscope (100 x objective). A completely at random design with subsampling was used.

The temperature change from cool to thaw caused damage to spermatozoa membranes. The damage caused a significant decrease ($P < 0.05$) in the percentage of live spermatozoa with intact acrosome in the thawed semen. The percentage of live spermatozoa with intact acrosome decreased in the breeds, Yorkshire, Landrace and Duroc: 40.7, 45.5 and 46.0% respectively. In the Yorkshire breed, there was a significant increase ($P < 0.05$) in the percentage of live spermatozoa without acrosome (6.40%). In thawed semen, the Yorkshire breed had the highest percentage of live spermatozoa with intact acrosome, after the Landrace breed and Duroc with the lower percentage.

The cryopreservation process causes damage to spermatozoa membranes and loss of acrosome in cryopreserved spermatozoa.

Key words: acrosoma, spermatozoa, pigs, genotype, cryopreservation

Short title: Cryopreservation and acrosoma damage in pigs

INTRODUCCIÓN

El problema que presenta la criopreservación no es la habilidad de la célula espermática para mantenerse viable durante el almacenaje a -196°C , sino la combinación de efectos que en el proceso del congelado-descongelado, tienen sobre la fisiología y morfología espermática, al pasar la célula por un intervalo de temperatura crítica de -15°C a -60°C , durante el cual se producen fenómenos que se derivan del proceso de enfriado, como la formación de cristales intra y extra celular, deshidratación y distorsión de la membrana (Palacios 1994; Watson 1995). Varios organelos de la célula espermática están envueltos por una membrana y es sabido que las membranas espermáticas afectadas por la criopreservación incluyen la plasmática, las acrosomales y las mitocondriales. Como consecuencia de ello en muchas especies la fertilidad de los animales inseminados artificialmente con semen descongelado es más pobre comparada con la del semen fresco, lo cual solo puede ser parcialmente compensado, inseminando con un mayor número de espermatozoides (Watson 1995).

El espermatozoide, es una célula especializada, cuyo papel único o principal es el de transportar el genoma paterno hasta el óvulo. La membrana plasmática es esencial para la vida de la célula, define los límites celulares y mantiene las diferencias entre el citosol y el medio ambiente celular. El acrosoma es un organelo en forma de capuchón, envuelto en una membrana que se adapta estrechamente a los contornos de la parte anterior de núcleo, el contenido acrosómico es rico en enzimas como: glucosidasas ácidas, proteasa, enterasas, fosfatas ácida y arisulfatasa que permiten al espermatozoide atravesar las envolturas que recubren al ovocito. Durante la RA, el contenido del acrosoma es liberado (Nicholas 1989). La forma y tamaño del acrosoma, varía considerablemente entre las especies.

El acrosoma desempeña un papel muy activo durante la fecundación (Fawcett 1970; Haila y Tulsiani 2000). Durante los pasos finales que preceden a la fertilización, las membranas que rodean la cabeza del espermatozoide experimentan considerables cambios estructurales. Por ello, cualquier daño en la estructura fina de la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide, podrían interferir con la capacitación, la reacción acrosomal, y/o la fusión del espermatozoide con el óvulo (Buhr et al 1991). Los efectos de la criopreservación de semen de cerdos han sido estudiados ya en este laboratorio (ver por ejemplo, Orozco et al 2008; Navarrete et al 2010).

El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar los daños que experimenta el acrosoma del espermatozoide por el proceso de criopreservación en diferentes razas de cerdos. Un informe preliminar de este experimento fue hecho oportunamente (Orozco et al 2010).

MATERIALES Y MÉTODOS

La evaluación seminal se llevó a cabo en sementales localizados en el municipio nayarita de Compostela. Se utilizó un semental de cada raza comercial (Yorkshire, Landrace y Duroc). La colección se realizó en las horas más frescas del día, por medio de la técnica de mano enguantada, (Rillo-Martín et al 1996). Se obtuvieron tres eyaculados por cada semental en forma alternada.

Inmediatamente después de obtener el eyaculado, se realizó la evaluación macroscópica y microscópica, para determinar la calidad del eyaculado. Sólo se congelaron eyaculados con las características que se listan en la tabla 1.

Tabla 1. Características de los eyaculados usados en la evaluación seminal¹

Índice	Valor
Motilidad	>80%
Morfoanomalías	<15%
Espermatozoides	300 x 10 ⁶ /mL

¹ Según recomendaciones de Córdova et al (1995) y Hernández 1998)

Se usó la técnica de Triple tinción (Talbot y Chacon, 1981). Se tomó una alícuota del semen fresco y descongelado y se lavó por centrifugación/resuspensión a 2 000 rpm/5 min, con PBS (NaCl 137mM, KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM y Na₂HPO₄ 9.6 mM, pH 7.4) para retirar el exceso de diluyente o yema de huevo. Se utilizó una muestra de 100 µL de semen con una concentración espermática aproximada de 35X10⁶ y se adicionaron 100 µL de azul tripán (al 2% en PBS), se incubó a 37°C en baño de María durante 15 minutos. Después se lavó la muestra con PBS por centrifugación/resuspensión a 1 200 rpm/3 minutos, para retirar el exceso de colorante. A continuación, el material se fijó con 100 µL de glutaraldehído (al 3% en amortiguador de cacodilato 0.1 M a pH 7.4), y se refrigeró a 4°C durante 30 minutos.

Posteriormente por centrifugación/resuspensión se lavo la muestra con PBS a 1200 rpm/8 minutos, el sobrenadante se desechó y el sedimento fue resuspendido en 100 µL de PBS; se tomaron 30 µL, para hacer un frotis que se dejó secar al aire. El frotis se sumergió en café Bismack (al 0.8% en solución acuosa pH 1.8) en baño María a 37°C durante 15 minutos, luego se lavó con agua destilada para retirar el exceso de colorante, y se tiñó con colorante rosa de bengala (al 0.8% en amortiguador Tris 0.1M, pH 5.3) a temperatura ambiente durante 15 minutos, se lavó con agua destilada y se dejó secar al aire para su observación al microscopio de luz con el objetivo de (100x). Se contaron 100 espermatozoides para cada muestra Los espermatozoides fueron clasificados de acuerdo con los detalles que aparecen en la tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de los espermatozoides

Tipo de espermatozoide	Color
Vivo, con acrosoma intacto	Café o carmelita, sobre la región posacrosomal/rosa sobre la región acrosomal
Vivo, sin acrosoma	Café sobre la región posacrosomal/sin tinción en la región acrosomal
Muerto, con acrosoma intacto	Azul sobre la región posacrosomal/rosa sobre la región acrosomal
Muerto, sin acrosoma	Azul sobre la región posacrosomal/sin tinción sobre la región acrosomal

El diseño utilizado fue completamente al azar con submuestreo, considerando como submuestreo los diferentes eyaculados en cada raza. El modelo correspondiente fue:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + Eya_{ci}(T_i) + e_{ijk}$$

Los detalles del modelo se presentan en la tabla 3.

Item	Detalle
Y_{ijk}	Es una observación de la variable dependiente
μ	Es la media general
T_i	Es el efecto fijo del genotipo
$Eya_{ci}(T_i)$	Es el efecto del eyaculado dentro del genotipo
e_{ijk}	Es el error aleatorio

Los datos se analizaron con un análisis de varianza, de acuerdo a la metodología descrita por Steel et al (1997), empleando el paquete computacional SAS (1997), comparando las medias para establecer sus diferencias, con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la temperatura sobre los espermatozoides vivos con acrosoma intacto se muestran en la figura 1. Se evidencia una disminución significativa ($P < 0.05$) de espermatozoides vivos con acrosoma intacto por el efecto de la temperatura de criopreservación en los diferentes grupos raciales estudiados. El cambio de temperatura de fresco a descongelado provocó daños en las membranas de los espermatozoides. Los daños ocasionaron una disminución significativa ($P < 0.05$) en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto, en el semen descongelado.

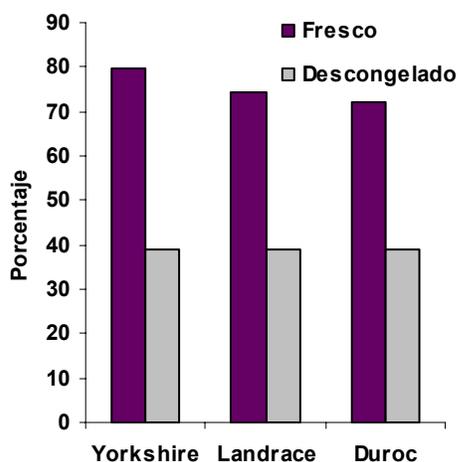


Figura 1. Porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto en semen fresco y descongelado de cerdos

El porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto disminuyó en las razas; Yorkshire, Landrace y Duroc en 40.76, 45.50 y 46.04% respectivamente. Al evaluar los espermatozoides vivos con acrosoma intacto en esta investigación, se encontró que la temperatura de criopreservación provocó daños en las membranas ocasionando en el espermatozoide una prematura reacción acrosomal, provocando una disminución significativa ($P < 0.05$), de espermatozoides vivos con acrosoma intacto en semen descongelado.

Los datos referentes a los espermatozoides vivos sin acrosoma aparecen en la tabla 4.

Tabla 4. Estado de los espermatozoides vivos sin acrosoma en sementales porcinos

Razas	Fresco	Descongelado
Yorkshire	6.66 ^b	13.06 ^a
Landrace	9.00 ^a	12.53 ^a
Duroc	14.00 ^a	12.43 ^a
EE ±	1.01*	0.30*

* $P < 0.05$

^{ab}Medias en la misma columna sin letra en común son diferentes significativamente ($P < 0.05$) diferentes entre sí

En la raza Yorkshire, se observó un aumento significativo ($P < 0.05$) en el porcentaje de espermatozoides vivos sin acrosoma de 6.40%. Esta misma raza Yorkshire mostró el mayor porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto, la raza Landrace en segundo lugar y con el menor porcentaje la raza Duroc. Estos resultados coinciden con los informados por Arancibia et al (2007), quienes al evaluar semen congelado de cerdo con la técnica de Thilmant, encontraron una disminución en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto, hallaron en la raza Yorkshire el mejor porcentaje comparado con la raza Landrace y Duroc. Igualmente, en nuestro laboratorio también se ha hallado que los cerdos Yorkshire son los que menos daño mostraron en la teca perinuclear de espermatozoides congelados/descongelados (Orozco et al 2008).

Por otro lado Flores (2005), obtuvo una disminución del 20% de espermatozoides con acrosomas normales cuando congeló semen de cerdo con tasas de enfriado lento. Watson, (2000); y De Leeuw, et al (1991), hallaron que la pérdida de la membrana acrosomal, se ha asociado al choque por frío. La mejor preservación de la integridad de la membrana acrosomal puede estar asociada a condiciones favorables al momento de congelar, ya que el daño a esta estructura ocasiona disrupción y pérdida de la membrana acrosomal, asociados al choque por frío (Watson 1995; De Leeuw, et al 1991; Matás et al 2002; Ruiz et al 2002), al proceso de formación de hielo intracelular (Mazur 1985), y al proceso de transición de fases de la membrana lipídica (Holt y North 1984).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a COCYTEN por el apoyo económico otorgado para la realización de esta investigación dentro del Proyecto de Fondos Sectoriales SAGARPA-CONACYT C01-1472-2005. Igualmente se agradece a los técnicos del Laboratorio de Reproducción Animal, en la Unidad Académica

de Medicina Veterinaria, Universidad Autónoma de Nayarit, en Compostela, Nayarit.

REFERENCIAS

- Arancibia, K., Juárez, M.L., Montaldo, H.H., Gutiérrez, C.G., Trujillo, O.M.G., Hernández, E.O. y Muñoz, G.R. 2007. Morphological perinuclear theca alterations are related to acrosome loss in cryopreserved boar spermatozoa. *Veterinary Research*, 1:49-56
- Buhr, M.M. 1991. Preservation of boar semen alters membrane molecular dynamics. In: *Second International Conference on Boar Semen Preservation*. Beltsville, p 95-104
- Córdova, A. y Gutiérrez, J.F. 2002. In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 mL straws. *Theriogenology*, 57:2119-2128
- De Leeuw, F.E., Colenbrander, B. y Verkleij, A.J. 1991. The role that membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reproduction in Domestic Animal*, Supplement 1:95-104
- Fawcett, D. 1970. A comparative view of sperm, ultrastructure. *Biology of Reproduction*, Supplement, 2:90-127
- Flores, G.H.F. 2005. Efecto del enfriado lento hasta -5°C previo a la congelación sobre la estructura y funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide porcino. Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal de México, pp
- Haila, A. y Tulsiani, D. 2000. Mammalian sperm acrosoma formation contents and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 379:173-182
- Hernández, B.J.A. 1998. Técnicas de Congelamiento en Reproducción. In: *Manual de Procesamiento de Semen Porcino*. Universidad Autónoma de Nuevo Laredo. Marín, pp
- Holt, W.V. y North, R.D. 1984. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *Journal of Experimental Zoology*, 230:473-483
- Martin Rillo, S., Martínez, E., García, A.C. y De Alba, C. 1996. Boar semen evaluation in practice. *Reproduction in Domestic Animal*, 31:519-526
- Matás, C., Marco, M. y Gadea, J. 2002. The effect of different treatments of fresh and frozen semen on acrosome reaction. *Reproduction in Domestic Animals*, 37:243
- Mazur, P. 1985. Basic concepts in freezing cells. In: *Deep freezing of boar semen*. Swedish University of Agricultural Science Report. Uppsala, p 91-111
- Navarrete, R., Benítez, J.A., Orozco, M.G., Lemus, C., Acosta, M.J. y Hernández Ballesteros, J.A. 2010. Evaluación de alteraciones acrosomales en espermatozoides congelados/descongelados de cerdos. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 17:285-289
- Nicholas, L.C. y Stanley, M. 1989. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biology of Reproduction*, 41:635-641
- Orozco, M.G., Lemus, C., González, C.A., Morleo, C., Navarrete, R. y Hernández, J.A. 2010. Daños en el acrosoma del espermatozoide por el proceso de criopreservación en cerdos de razas comerciales. In: *Seminario de Porcicultura Tropical*. La Habana, versión electrónica disponible en disco compacto ISBN 978 959 7208 07 5
- Orozco, M.G., Lemus, C., Hernández, J.A., Navarrete, R. y Juárez, M.L. 2008. Alterations of domains in the plasmatic membrana due to damages of the perinuclear theca of pig preserved spermatozoa. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11:1360-1364
- Palacios, A.A. 1994. Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento de semen. *Veterinaria de México*, 25:207-210
- Ruiz, S., Sellés, E., Gadea, J., Marco, M. y Murgas, L. 2002. Effect of freezing rate on boar semen frozen: preliminary results of A.I. *Theriogenology*, 57:480
- SAS. 1997. *Statistical Analysis Systems (SAS) Institute*. Stat version. Cary, versión electrónica disponible en disco compacto
- Steel, R.G.W., Torrie, J.H. y Dickey, M. 1997. *Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach*. McGraw-Hill Book Company In Company. New York, pp 667
- Talbot, P. y Chacón, R. 1981. A triple stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *Journal of Experimental Zoology*, 215:201-208
- Watson, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7:871-891
- Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 61:481-492
- Westendorf, P., Richter, L. y Treu, H. 1975. Zur Tiefgefrierung von Ebesperma. *Laboround Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Pailletenverfahren*. *Deutsche Tierärztlichen Wochenschrift*, 82:261-267