

COMUNICACIÓN

VARIACIÓN INDIVIDUAL EN LA SUSCEPTIBILIDAD DEL SEMEN PORCINO AL CONGELADO-DESCONGELADO

INTER-INDIVIDUAL BOAR SPERM SUSCEPTIBILITY TO FREEZING-THAWING PROTOCOLS

Medrano, A. y W.V. Holt

Institute of Zoology. The Zoological Society of London. Regent's Park. London NW1 4RY. Reino Unido.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Criomicroscopía. Tinciones fluorescentes. *Pellets*. Análisis por clusters.

ADDITIONAL KEYWORDS

Cryomicroscopy. Fluorescent probes. Pellet freezing. Cluster Analysis.

RESUMEN

En este trabajo se estudió la variabilidad en la supervivencia del semen porcino de diferentes individuos al congelado-descongelado.

En primer lugar, se empleó un sistema estandarizado de congelación (*pellets* en CO₂) para comprobar la existencia de individuos cuyo semen es relativamente resistente (llamados *good freezers*) o muy susceptible (*bad freezers*) al proceso de congelación-descongelación.

En segundo lugar, se evaluó el efecto de la tasa de congelación en la criosobrevivencia espermática entre individuos y entre eyaculados, por medio de criomicroscopía.

Los resultados indican que la susceptibilidad entre individuos parece ser más importante que la tasa de congelación en la criosobrevivencia espermática.

Se observó además, por medio de criomicroscopía con tinciones fluorescentes, que la membrana plasmática del espermatozoide se mantiene intacta durante el congelado pero al descongelado se manifiesta la ruptura de esta estructura. Diferencias en la composición química de la membrana espermática podrían explicar la variabilidad individual al congelado-descongelado.

SUMMARY

Pig sperm cryopreservation is still not used routinely because of the sensitivity of pig spermatozoa to cold shock, and because cryosurvival is affected by between individual variation. Individual variation has been recognised by the farm industry in the sense that males are classified as either *good* or *bad* freezers. This is an interesting aspect of cryobiology which provides a model to study the source of that variation. To address that issue a series of experiments was undertaken. In order to identify *good* and *bad* freezers, spermatozoa from 16 boars housed at an A.I centre were frozen using a standard technique. Spermatozoa from four boars had higher post-thawing values of motility and membrane integrity than the rest. In the next experiment three cooling rates (15, 30, 60°C/min) from -5°C to -50°C were tested on the sperm survival of ten ejaculates from five boars. Fluorescent probes, as membrane integrity reporters, were employed in combination with cryomicroscopy to detect the critical steps of the process. This approach allows observation of the spermatozoa during the freeze-thawing process and estimation of the proportion suffering

Arch. Zootec. 47: 319-327. 1998.

membrane damage, and the moment when it happens. Two groups of samples were identified by Cluster Analysis: (1) resisters and (2) susceptibles, irrespective of cooling rate. Also, it was observed that, during freezing membrane integrity was maintained but at rewarming damage was manifested. In future experiments thermal properties of the sperm membranes from individuals regarded as *good* and *bad* freezers will be analyzed employing plasma membrane markers.

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (I.A.) empleando semen congelado-descongelado no es una práctica común en la crianza de cerdos a nivel comercial debido a que la fertilidad obtenida es baja generalmente (Johnson 1985). La causa de esta baja fertilidad es una combinación de efectos detrimentales en la fisiología y morfología de los espermatozoides durante el proceso de congelado-descongelado. El semen porcino es muy susceptible a dichos procedimientos, especialmente al choque frío (Watson y Morris, 1987). Los métodos estándar de congelación-descongelación empleados en otras especies no producen resultados equivalentes en el semen porcino debido a la susceptibilidad de cada individuo a la criopreservación: el semen de algunos cerdos sobrevive a la congelación con menor daño que el de otros, independientemente de su calidad inicial. Por esta razón, a los primeros se les ha llamado *good freezers*, y *bad freezers* a los segundos (Watson 1995).

El sistema y el protocolo de congelación también afectan la criosobrevivencia espermática. La tasa de

congelado modifica la dinámica de la formación de hielo y el compartimiento (intra o extracelular) donde este se forma. Cabe añadir que la formación intracelular de hielo debe evitarse para reducir el daño celular. El sistema de envasado del semen es importante porque permite o interfiere con la eficiente disipación del calor.

Desde el punto de vista de la investigación, la criomicroscopía representa una herramienta muy útil para estudiar las condiciones a las que los espermatozoides son sometidos durante la congelación y la descongelación. Este sistema permite controlar la temperatura de manera muy precisa y observar a los espermatozoides durante el proceso. El uso combinado de la criomicroscopía y tinciones fluorescentes para evaluar la integridad de la membrana puede contribuir al conocimiento de las causas que ocasionan la pobre criosobrevivencia de los espermatozoides porcinos. Los objetivos de este trabajo son comparar la susceptibilidad del semen entre individuos al congelado-descongelado, empleando un sistema estandarizado de congelación; además, evaluar el efecto de la tasa de congelado en la criosobrevivencia espermática de diferentes cerdos y diferentes eyaculados.

MATERIAL Y MÉTODOS

CONGELADO EN PELLETS

El semen fue obtenido manualmente de 16 cerdos alojados en un centro de procesamiento de semen para inseminación artificial (JSR Healthbred Ltd. York, Inglaterra) y congelado según el método de Pursel y Johnson (1975).

VARIACIÓN INDIVIDUAL ANTE LA CONGELACIÓN EN SEMEN PORCINO

Las muestras se mantuvieron 2 horas a temperatura ambiente, posteriormente fueron centrifugadas y el sobrenadante fue eliminado. Los espermatozoides fueron diluidos con medio BF5 sin glicerol y enfriados lentamente hasta 5°C. La fracción glicerolada del diluyente se agregó entonces para ajustar la concentración final de glicerol (1 p.100) y la concentración espermática ($120 \times 10^6/\text{ml}$).

Para hacer los *pellets* se colocaron pequeñas gotas de semen diluido (0,1-0,2 ml), en pequeñas cavidades excavadas en la superficie de un bloque de CO₂. El semen permaneció en CO₂ por 3-4 minutos, posteriormente fue depositado en tubos de plástico y fue almacenado en nitrógeno líquido.

El descongelado de los *pellets* se hizo mezclando estos con Beltsville Thawing Solution (BTS) a 41°C durante 2-3 minutos. El semen descongelado fue filtrado en columnas de sephadex y los espermatozoides fueron retenidos en filtros Millipore de tal manera que el medio BTS fue separado de ellos. Los espermatozoides fueron recobrados lavando los filtros con medio de Tyrode (con bicarbonato de sodio), posteriormente fueron incubados por una hora a 39°C en 5 p.100 CO₂.

Los marcadores fluorescentes SYBR14 (100 nM) y yoduro de propidio (12 µM) (Molecular Probes, Oregon) fueron empleados como indicadores de la integridad de la membrana (Garner y Johnson, 1995). El número de células positivas a SYBR14 y a yoduro de propidio (PI) se estimó de cintas grabadas del microscopio con luz fluorescente.

El porcentaje de espermatozoides

móviles se estimó de grabaciones hechas en tres momentos: (1) inmediatamente después del descongelado, (2) después de la filtración en sephadex, y (3) después de una hora de incubación, con la ayuda del programa Hobson Sperm Tracker.

PREPARACIÓN DE LAS COLUMNAS DE SEPHADEX

Sephadex G-100 (Pharmacia Uppsala, Sweden) fue activado en una solución de citrato de sodio (2,9 p.100 w/v) a 5°C por 16 horas. Enseguida, 2 ml de esta mezcla fueron vertidos en jeringas de plástico (5 ml); el flujo fue regulado por medio de un tubo de plástico ajustado a la punta de la jeringa y una pinza. Antes de la filtración, las columnas fueron lavadas con medio Tyrodes a 39°C para remover el citrato de sodio y para calentar la columna.

CONGELADO EN EL CRIOMICROSCOPIO

El criomicroscopio empleado en este trabajo (Planer CM-3, Sunburyon-Thames, Inglaterra) esta compuesto de un microscopio Zeiss Axioskop con una platina diseñada para conducir nitrógeno gaseoso, y un sensor eléctrico que permite monitorizar y controlar la temperatura de la muestra. Además, esta equipado con un sistema de luz fluorescente. Otros detalles del criomicroscopio se han publicado previamente (Holt 1992).

Para estos experimentos se usaron 20 eyaculados (réplicas) provenientes de 13 cerdos. Las muestras fueron centrifugadas, el sobrenadante eliminado, y los espermatozoides resuspendidos en medio BF5. Los marcadores fluorescentes SYBR14 y PI se adicionaron al semen diluido. Enseguida se

procedió a enfriar lentamente el semen hasta alcanzar 5°C en un periodo de 2 horas, en ese momento se agregó la segunda mitad del diluyente con glicerol. A continuación, alícuotas de la muestra (5 µl) fueron depositadas en cámaras de vidrio, y estas colocadas sobre el sensor del criomicroscopio. Las muestras fueron enfriadas de +5°C a -5°C a una tasa de 6°C/min y se les mantuvo 2 minutos a esta temperatura. Enseguida fueron congeladas de -5°C a -50°C a: (1) 15°C, (2) 30°C, (3) 60°C/min, se les mantuvo 2 minutos a -50°C e inmediatamente fueron descongeladas a una tasa de 60°C/min hasta alcanzar 30°C.

La integridad de la membrana plasmática se evaluó monitorizando el número de células positivas a PI, a intervalos a través del proceso (+5°C,

-5°C, -50°C, 30°C), dentro del mismo campo de observación.

El número de estas células fue estimado de cintas grabadas del criomicroscopio con luz fluorescente con la ayuda de una vídeo cámara (Hamamatsu C2400 SIT).

El porcentaje de espermatozoides móviles fue estimado de cintas grabadas de un microscopio de contraste de fases con platina caliente a 39°C, con la ayuda del programa Hobson Sperm Tracker.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos provenientes del experimento de congelación en *pellets*, expresados en porcentaje (células positivas a SYBR14 y células móviles) fueron transformados al arcoseno antes de ser analizados por ANOVA si-

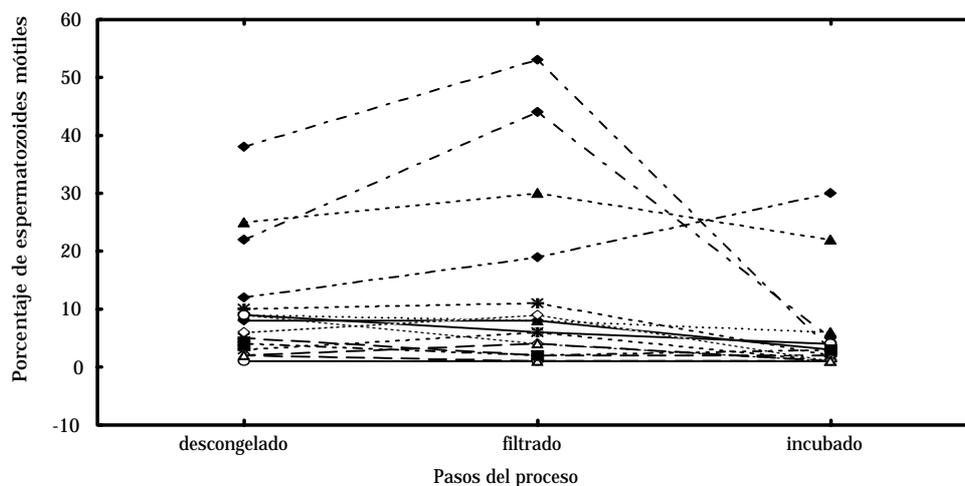


Figura 1. Espermatozoides móviles (p.100) en 3 pasos del proceso post-congelación en *pellets*. Las líneas representan individuos (cerdos); los valores son medias, el error estándar no ha sido incluido en cada línea ($sem = 1,76$). (Motile sperm (percent) at 3 processing stages after dry ice-pellet freezing. Lines represent individual boars. Values are means; standard errors were omitted for clarity ($sem = 1.76$)).

VARIACIÓN INDIVIDUAL ANTE LA CONGELACIÓN EN SEMEN PORCINO

guiendo un modelo de efectos fijos.

El número de células positivas a PI durante el proceso de congelado-descongelado en el criomicroscopio fue comparado en pares por la prueba de Wilcoxon.

El análisis por clusters, de los datos obtenidos de los experimentos en el criomicroscopio, se realizó empleando 3 métodos de agrupamiento: simple, completo, y el de Ward.

El número de grupos identificados de esa manera se empleó para realizar un análisis por el método K-medias. Los datos considerados para el análisis por clusters fueron: (1) la motilidad al descongelado transformada al arco-seno, y (2) el aumento proporcional en el número de espermatozoides positivos a PI al descongelado, producido por las diferentes tasas de congelado.

Estos datos fueron estandarizados tomando como base (100 p.100) el número de células positivas a PI a 5°C, el número de estas células a -5°C, -50°C, y 30°C fue considerado como aumento proporcional.

RESULTADOS

CONGELADO EN *pellets*

Existieron diferencias significativas en el porcentaje de células móviles al descongelado entre cerdos ($p < 0,0002$); considerando estas diferencias fue posible distinguir 2 grupos: uno de ellos formado por 4 individuos que presentó valores de motilidad relativamente altos, y otro compuesto de 12 individuos cuyos valores de motilidad fueron bajos. Sin embargo, después del periodo

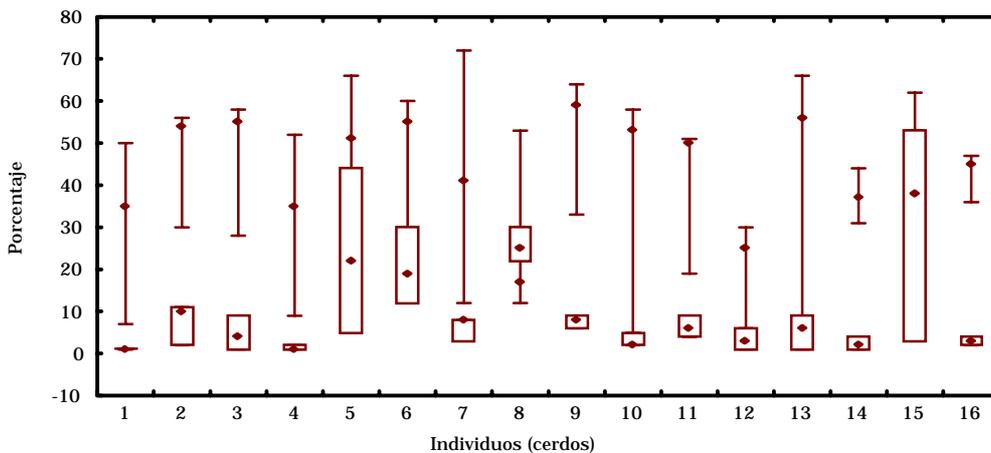


Figura 2. Espermatozoides móviles y con membrana plasmática intacta (p.100) post-congelación en pellets. Los rectángulos representan la motilidad, las líneas a las células con membrana intacta. Los valores son medias \pm desviación estándar de los 3 pasos del proceso post-congelación. (Motile and plasma membrane-intact sperm (percent) after dry ice-pellet freezing. Values are means (\pm SD) of 3 processing stages. Boxes represent motility, lines represent plasma membrane intact cells).

de incubación por una hora solamente 2 muestras mantuvieron buena motilidad (**figura 1**).

Existieron diferencias significativas en el porcentaje de células positivas a SYBR14 al descongelado entre cerdos. La filtración en sephadex aumentó significativamente el porcentaje de células positivas a SYBR14 ($p < 0,0001$), este porcentaje se mantuvo constante después de una hora de incubación.

Un aspecto de interés es el hecho de que muchas muestras presentaron valores altos de células con membrana intacta (positivas a SYBR14) y al mismo tiempo valores bajos de motilidad (**figura 2**).

CONGELADO EN EL CRIOMICROSCOPIO

Existieron diferencias significativas en el porcentaje de células móviles

entre individuos ($p < 0,0001$); la interacción individuo*tasa de congelado, aunque significativa, no se consideró importante ($p < 0,01$). El análisis por clusters distribuyó los 20 eyaculados en 3 grupos: el grupo 3 (ocho eyaculados) presentó mayores valores de motilidad y menores en la proporción de células con membrana dañada (positivas a PI) que el grupo 1 (seis eyaculados) y el grupo 2 (seis eyaculados). Estos últimos fueron diferentes entre sí en la proporción de células muertas; los valores de motilidad fueron similares.

Considerando el agrupamiento anterior los cerdos fueron clasificados como *good* (grupo 3) o *bad freezers* (grupos 1 y 2) (**figura 3**).

El número de células positivas a PI obtenido a través del proceso mostró que la permeabilidad de la membrana

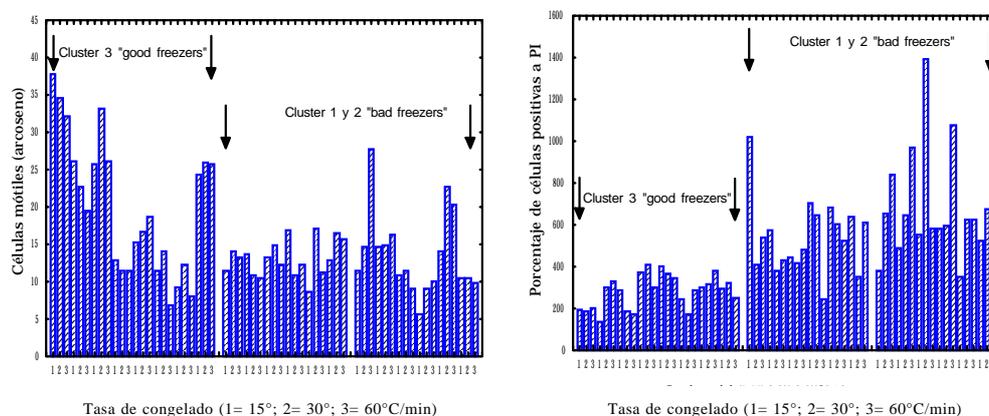


Figura 3. Agrupamiento en clusters por motilidad (izquierda) y por membrana plasmática dañada (derecha) al descongelado. Cada grupo de 3 barras representa eyaculados individuales congelados a 3 tasas de congelación en el criomicroscopio. (Cluster grouping for motility (left) and proportion of plasma membrane-damaged sperm (right) after thawing. Each group of 3 bars represent individual eyaculates frozen at 3 cooling rates in the cryomicroscope).

VARIACIÓN INDIVIDUAL ANTE LA CONGELACIÓN EN SEMEN PORCINO

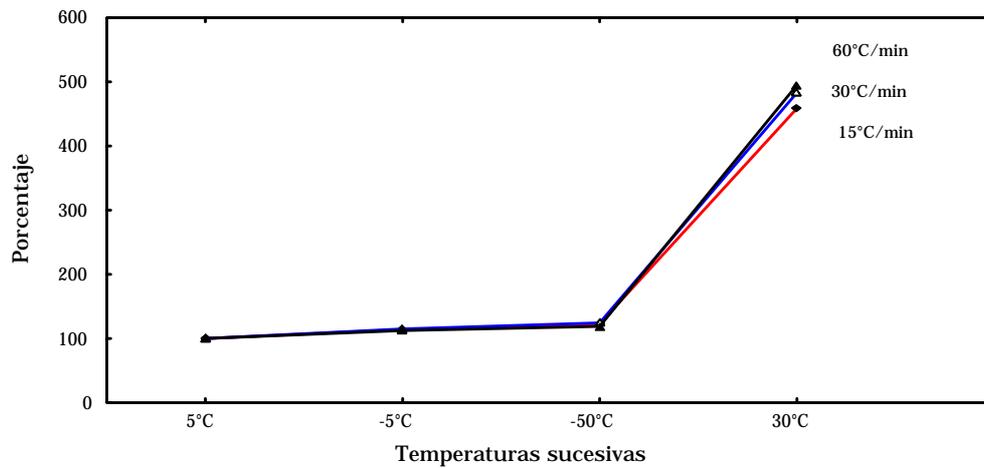


Figura 4. Cambios en la proporción de espermatozoides con membrana plasmática dañada (positivos a PI) durante el congelado y al descongelado. (Changes in the proportion of plasma membrane-damaged sperm (PI+ve) during freezing and thawing).

se mantuvo constante durante el enfriamiento y el congelado, pero al descongelado ocurrió un aumento significativo en la proporción de células con membrana dañada. (**figura 4**).

DISCUSIÓN

El congelado en *pellets* es un sistema que proporciona condiciones uniformes de congelado para probar la criosobrevivencia espermática de diferentes individuos. De esta manera la variación observada es atribuida principalmente al factor individuo. Este aspecto es importante porque permite separar el efecto de la susceptibilidad individual del efecto ocasionado por la tasa de congelación, este último considerado el factor más importante del proceso (Fiser y Fairfull 1990). Sin embargo, al igual que el congelado en

pajuelas la tasa de congelación en el centro y en la periferia de los *pellets* varía considerablemente. La tasa de congelación es más rápida y uniforme en la base del *pellet* que en la parte superior o en el centro (Lightfoot y Salamon, 1969). No obstante esta variación, el semen de todos los cerdos fue sometido al mismo proceso y en consecuencia la criosobrevivencia observada indica que la diferencia entre individuos es un factor de mayor importancia. Es notable la eficiente selectividad de las columnas de sephadex para separar espermatozoides vivos (SYBR 14 positivos) y muertos (PI positivos), también es notable que una gran proporción de espermatozoides SYBR14 positivos eran inmóviles. Esta observación indica que los espermatozoides que sobreviven a la congelación y descongelación son morfológicamente normales pero metabólicamente inaptos.

Los experimentos realizados en el criomicroscopio para evaluar el efecto de la tasa de congelación, indican que en el rango de 15°C/min a 60°C/min este factor no produce diferencias en la criosobrevivencia espermática intra-eyaculado. La observación más importante deducida es la existencia de individuos con diferente susceptibilidad al estrés de la congelación-descongelación y esta, parece independiente de la optimización del proceso con respecto a la tasa de congelado.

Se considera que la composición química de la membrana plasmática del espermatozoide es responsable de la susceptibilidad al congelado entre

especies (Darin-Bennett y White 1977; Parks y Lynch 1992). Sin embargo, diferencias intra-especies podrían contribuir a la variabilidad individual.

Esta serie de experimentos ha mostrado que la susceptibilidad espermática entre individuos (cerdos) al congelado-descongelado es un factor determinante del proceso. Esta variabilidad se manifestó después del congelado en un sistema estandarizado (*pellets*), así como en un sistema que permite emplear diferentes tasas de congelación con alta precisión (criomicroscopía). Experimentos futuros han de dirigirse a identificar las fuentes de variación entre individuos.

BIBLIOGRAFÍA

- Darin-Bennett, A. and I.G. White. 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, 14: 466-470.
- Fiser, P.S. and R.W. Fairfull. 1990. Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 ml straws. *Mol. Reprod. and Develop.*, 25: 123-129.
- Garner, D.L. and L.A. Johnson. 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of Reproduction*, 53: 276-284.
- Holt, W.V. 1992. Light microscopy of spermatozoa at low temperatures. *Microscopy and Analysis*. March 28: 21-23.
- Johnson, L.A. 1985. Fertility results using frozen boar spermatozoa: 1970 to 1985. En First International Conference on Deep Freezing of Boar Semen. L. A. Johnson y K. Larsson (eds). Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweden. pp 199-222.
- Lightfoot, R.J. and S. Salamon. 1969. Freezing ram semen by the pellet method. III. The effects of pellet volume, composition of the thawing solution and reconcentration of the thawed semen on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, 22: 1561-1572.
- Parks, J.E. and D.V. Lynch. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29: 255-266.
- Pursel, V.G. and L.A. Johnson. 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.*, 40: 99-102.

VARIACIÓN INDIVIDUAL ANTE LA CONGELACIÓN EN SEMEN PORCINO

Watson, P.F. and G. Morris. 1987. Cold shock injury in animal cells. En Temperature and animal cells. B. K. y F. B. (eds). The Company of Biologist Limited. pp 311-340.

Watson, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7: 871-891.