



Efecto de la radiación con laser de He-Ne sobre la motilidad y los parámetros bioquímicos de espermatozoides de conejo durante su conservación

Effect of the He-Ne laser irradiation on motility and biochemical parameters of rabbit spermatozoa during storage

Laffaldano N.¹, Rosato M. P.¹, Paventi G.¹, Pizzuto R.¹, Gambacorta M.¹, Manchisi A.¹, Rebollar P.G.², Passarella S.¹

¹Department of Animal, Vegetable and Environmental Sciences, University of Molise, via De Sanctis, 86100 Campobasso, Italy.
C.Elect: nicolaia@unimol.it

²Departamento de Producción Animal, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain.

C.Elect: pilar.grebollar@upm.es

Resumen

El objetivo de este estudio fue investigar el efecto de diferentes dosis energéticas de radiaciones láser de Helio-Neón sobre algunos parámetros bioquímicos, como la recarga de energía (CE; suma de ATP, ADP y fracciones de AMP), y el contenido en aminoácidos libres de los espermatozoides de conejo, así como sobre la motilidad espermática durante 48 h de almacenamiento *in vitro* a 15° C. Ocho pooles de semen de conejo se dividieron en 4 alícuotas: una control y las otras tres fueron expuestas a dosis de 3,96, 6,12 y 9 J/cm² de un láser de He-Ne, respectivamente. La CE y el contenido en aminoácidos se determinó mediante HPLC una hora después de la radiación, mientras que la motilidad fue analizada usando el procedimiento Accudenz[®] a las 0 h (momento de la radiación), 24 h y 48 h de la radiación. El contenido en aminoácidos libres aumentó significativamente con la dosis de 6,12 J/m² con respecto al grupo control y los otros tratamientos de irradiación (P<0,05), mientras que la irradiación con láser a dosis de 3,96 y 6,12 J/cm² aumentó significativamente la CE (P<0,01) con respecto al control. Además, todas las dosis de radiación láser mejoraron significativamente la motilidad a las 24 y las 48 horas de almacenamiento (P>0,01). Esta técnica podría ser útil para mejorar la calidad del semen de conejo refrigerado.

Palabras clave: Semen de conejo, Láser de irradiación He-Ne, cambio de energía, aminoácidos, motilidad espermática.

Abstract

The aim of the study was to investigate the effects of different energy doses of Helium-Neon (He-Ne) laser irradiation on some biochemical parameters as energetic charge (EC; sum of the ATP, ADP and AMP fractions) and free aminoacids content of rabbit spermatozoa and on sperm motility during 48 h of *in vitro* liquid storage at 15°C. 8 rabbit semen pools were divided in four aliquots: the first was the control, the other three were exposed at 3.96, 6.12 and 9 J/cm² laser He-Ne energy doses, respectively. The EC and free aminoacids were quantified with HPLC 1 h after irradiation, whereas the motility was assessed using the Accudenz[®] procedure at 0 (the irradiation time), 24 and 48 h of storage. Free aminoacids content was significantly increased by the energy dose of 6.12 J/cm² than both the control and the other irradiation treatments (P<0.05), whereas laser irradiation at energy doses of 3.96 and 6.12 J/cm² significantly increased the EC (P<0.01) with respect to the control. Moreover, the laser irradiation at all energy doses utilized significantly improved (P>0.01) the motility at 24 and 48 h of storage. This technique could be useful to enhance the quality of stored rabbit semen.

Key words: rabbit semen; He-Ne laser irradiation; energy charge; aminoacids; sperm motility.



Introducción

El empleo del láser de Helio-Neón (HE-NE) a dosis bajas es eficaz para bioestimular las células espermáticas. Recientemente se ha demostrado dicho efecto en espermatozoides de pavo y conejo durante su almacenamiento (Iaffaldano et al., 2005; 2007). Estos autores han demostrado además que la irradiación láser de semen de pavo provoca un incremento de la carga energética (CE) de las células espermáticas. Sin embargo, no se ha investigado el efecto de dosis bajas de láser He-Ne sobre algunos parámetros bioquímicos del semen de conejo que pudieran explicar una calidad mejor del semen conservado. Por esto, nuestro objetivo fue investigar los efectos de diferentes dosis energéticas de radiación láser sobre la CE y el contenido en aminoácidos libres del espermatozoide de conejo, así como su efecto sobre la motilidad espermática durante 48 horas en un diluyente de conservación de semen a 15°C.

Material y métodos

Un total de 8 pools de semen de conejos híbridos se recolectaron con vagina artificial. Cada pool se dividió en 4 alícuotas, una de las cuales no fue irradiada (control). Las otras tres fueron sometidas a diferentes dosis (3,96, 6,12 and 9 J/cm² respectivamente) de radiación con una única onda continua de láser He-Ne (longitud de onda 632.8). Después, las muestras fueron diluidas a razón de 30 x 10⁶ espermatozoides/ml en un diluyente Tris-Buffer y se almacenaron durante 48 h a 15°C. Una hora después de la radiación se determinó, mediante HPLC, la CE y el contenido en aminoácidos libres (Giannattasio et al. 2003; Di Martino et al. 2006). La CE fue definida como la suma de las fracciones de ATP, ADP y AMP, empleando la siguiente ecuación: $EC = [ATP] + 0.5[ADP] / [ATP] + [ADP] + [AMP]$ (Giannattasio et al., 2003). La motilidad espermática se evaluó a las 0 (momento de la radiación), 24 y 48 horas de la conservación con la solución Accudenz[®], preparada de acuerdo al procedimiento descrito por Froman y McLean (1996). Los resultados se analizaron con el programa estadístico SPSS (2003), mediante un análisis de varianza seguido de una comparación de medias con el test de Duncan.

Resultados y discusión

Los resultados del efecto del láser He-Ne sobre la CE, los aminoácidos libres y la motilidad se muestran en las Figuras 1, 2 and 3, respectivamente. Las dosis de 3,96 y 6,12 J/cm² aumentaron significativamente la CE ($P < 0.01$), con respecto al grupo control. En estudios previos hemos observado de manera similar que la carga energética del semen de pavo aumenta cuando éste es irradiado (Iaffaldano et al. 2005). Teniendo en cuenta que el ATP de las células espermáticas producido en la mitocondria por fosforilación oxidativa es requerido para la motilidad espermática (Iaffaldano et al. 2005), en este estudio se muestra que con todas las dosis energéticas empleadas la radiación láser mejora significativamente ($P > 0.01$) la motilidad a las 24 y a las 48 horas de conservación. El contenido en aminoácidos libres aumentó significativamente con la dosis de 6,12 J/cm² más que con las otras dosis utilizadas ($P < 0.05$). El mecanismo por el cual se produce este incremento no ha sido dilucidado y se necesitan más estudios para esclarecer estos resultados.



En conclusión, la motilidad espermática durante las 48 horas de almacenamiento fue mejor en las muestras sometidas a la radiación láser y esta mejoría se puede asociar a un incremento de la CE y al contenido de aminoácidos libres. Se necesitan más estudios para evaluar los efectos de la radiación láser sobre la capacidad fecundante del semen de conejo conservado, así como para estudiar los mecanismos bioquímicos implicados después de la radiación láser sobre las células espermáticas. No obstante y a partir de este estudio preliminar, podemos decir que próximamente, esta técnica podría ser empleada para mejorar la calidad del semen de conejo conservado.

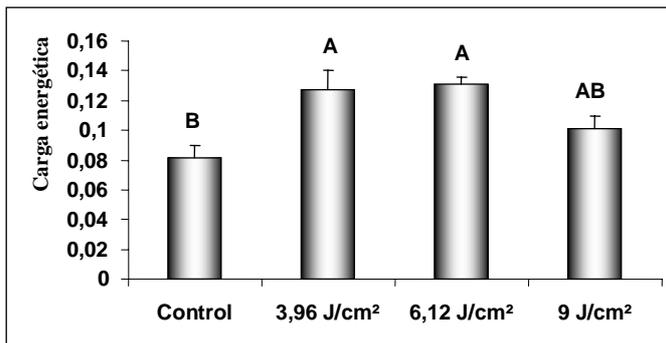


Figura 1. Carga energética del semen de conejo sometido a radiación con diferentes dosis energéticas de un láser He-Ne. (n=8). A-B: P<0.01.

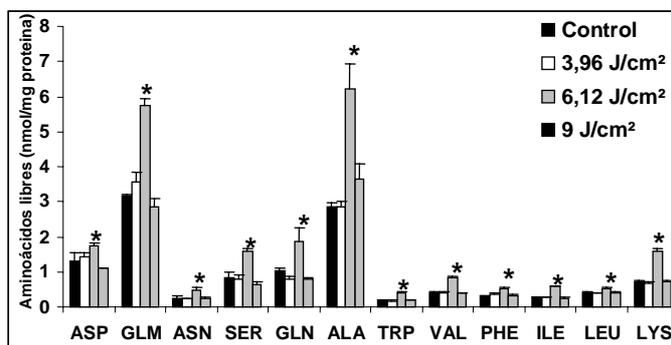


Figura 2. Contenido en aminoácidos libres del semen de conejo sometido a radiación con diferentes dosis energéticas de un láser He-Ne. (n=8). Las columnas con asterisco (*) son estadísticamente diferentes de las otras en cada aminoácido (P<0.05).

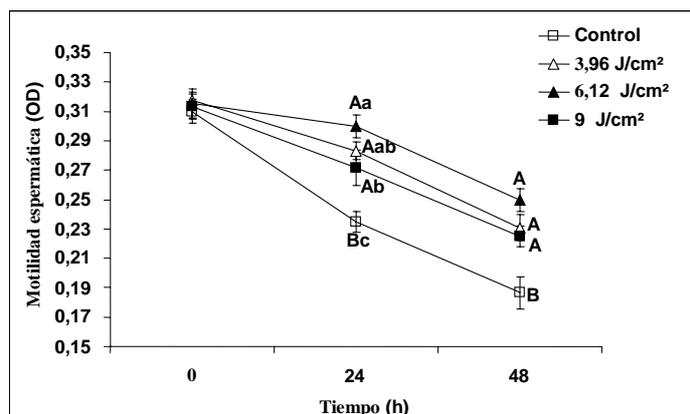


Figura 3. Efecto de la radiación con diferentes dosis energéticas de un láser He-Ne sobre la motilidad espermática a las 0, 24 y 48 horas de conservación a 15°C. (n=8) A-B: P<0.01; a-b: P<0.05.

Bibliografía

Di Martino C., Pizzuto R., Pallotta M.L., De Santis A, Passarella S. 2006. Mitochondrial transport in proline catabolism in plants: the existence of two separate translocators in mitochondria isolated from durum wheat seedlings. *Planta*. 223:1123-1133.

Froman D.P and McLean D.J. 1996. Objective measurement of sperm mobility based upon sperm penetration of Accudenz. *Poult. Sci.* 75:776–784.

Giannattasio S., Gagliardi S., Samaja M., Marra E. 2003. Simultaneous determination of purine nucleotides, their metabolites and beta-nicotinamide adenine dinucleotide in cerebellar granule cells by ion-pair high performance liquid chromatography. *Brain Res. Protoc.* 10:168–174.

Laffaldano N., Meluzzi A. Manchisi A., Passarella S. 2005. Improvement of stored turkey semen quality as a result of He-Ne laser irradiation. *Anim. Reprod. Sci.* 8:317-325.

Laffaldano N., Rosato M.P., Gambacorta M., Manchisi A., Pizzuto R., Paventi G., Passarella S. 2007. The He-Ne laser irradiation improves the quality of stored rabbit semen. Accepted for ASPA Conference, Alghero, Italy, may 28-30.

SPSS/PC + Statistics 12. 2003. SPSS, Inc., Chicago, IL.