

## **EFFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DE ESPERMATOZOIDES PORCINOS EN UN DILUYENTE DE LARGA DURACIÓN A 16 °C SOBRE EL ESTADO FUNCIONAL DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA**

**Conejo-Nava J\*,<sup>1,2</sup> Fierro PR<sup>2</sup>, Gutiérrez AC<sup>3</sup>, Betancourt MR<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. e-mail: conejonava@yahoo.com.mx. <sup>2</sup> Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. <sup>3</sup> Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.

**INTRODUCCION.** La inseminación artificial (IA) con semen conservado en diluyentes de larga duración después del quinto día de almacenamiento a 15-18 °C, resulta en una disminución en la tasa de partos y/o del tamaño de camada, aún cuando se mantiene una alta movilidad progresiva (Althouse, 1997; Conejo *et al*, 1997; Johnson *et al*, 2000). Con el propósito de mejorar este método de conservación del semen es importante conocer la (s) causa (s) de la disminución de la capacidad fertilizante del espermatozoide porcino.

Una de las pruebas ampliamente utilizadas para determinar los posibles cambios en el estado funcional del espermatozoide (no capacitado, capacitado y con reacción acrosomal) es la doble tinción basándose en clorotetraciclina (CTC) y Hoechst 33258 (Maxwell y Johnson, 1997). Mediante el ensayo de CTC, Mattioli *et al.* (1996), detectaron una reducción del tiempo de capacitación en los espermatozoides conservados en BTS durante 1 y 3 días, con respecto al semen fresco. Asimismo, se ha observado que los espermatozoides porcinos mantenidos en solución Tyrode o en PBS, bajo breves periodos de frio (15 °C, durante 90 min.) presentan cambios en las membranas espermáticas parecidos a la capacitación y a la reacción acrosomal (RA) (Watson, 1996; Maxwell y Johnson, 1997).

El presente trabajo fue realizado para determinar el efecto del tiempo de almacenamiento de los espermatozoides de cerdo en un diluyente de larga duración a 16 °C, sobre el estado funcional de la membrana plasmática, mediante la doble tinción CTC-Hoechst 33258. Adicionalmente se determinó la viabilidad espermática y la movilidad progresiva.

**MATERIAL Y METODO.** Se utilizaron cinco verracos adultos y de cada uno se obtuvieron dos eyaculados. De la fracción rica de semen fresco, se tomó una alícuota de 1 ml para su estudio y el resto del eyaculado fue diluido en el extensor Reading. El diluyente se preparó según Revell y Glossop (1989), a un pH de 6.4, 284 mOsm/kg. Se prepararon dosis de  $2.5 \times 10^9$  espermatozoides en 50 ml, se envasaron en botellas estériles de polietileno-tereftalato y se almacenaron en una incubadora a  $16 \pm 1$  °C hasta por 8 días. El semen diluido fue evaluado después de 0, 2, 4, 6 y 8 días de almacenamiento. Los parámetros en el tiempo 0 fueron considerados basales para el mismo eyaculado almacenado por 2, 4, 6 y 8 días. La movilidad progresiva se determinó después de incubar 1.0 ml de semen a 39 °C durante 10 min. Una gota de 20 µl de semen se colocó sobre un portaobjetos a 37 °C y la movilidad progresiva fue evaluada bajo un microscopio de campo claro, asignándose porcentajes de 0 a 90.

Para determinar la viabilidad espermática se utilizó Hoechst-33258, a una concentración final de 1 µg/ml, según el procedimiento de Berger (1990). A continuación se utilizó la tinción de CTC para determinar el estado de la membrana plasmática, de acuerdo con el procedimiento de Fraser y Herold (1990). Las preparaciones con doble tinción (CTC-H-33258) se analizaron bajo el microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss), a 1000 aumentos y se determinó el estado funcional

de los espermatozoides de acuerdo con los siguientes patrones de tinción: los espermatozoides no capacitados, se caracterizan por una fluorescencia distribuida uniformemente en la cabeza; los capacitados, muestran una fluorescencia concentrada en la región acrosomal y una banda no teñida en la región postacrosomal y, los espermatozoides con RA, no presentan fluorescencia en la cabeza, excepto una delgada banda en la región ecuatorial (Wang *et al* 1995, Johnson *et al* 1996, Watson 1996, Maxwell y Johnson, 1997). Se contaron como mínimo 200 células espermáticas por preparación. Las variables de respuesta se analizaron por medio de un análisis de varianza mixto, con mediciones repetidas. El nivel de confianza se tomó cuando  $p < 0.05$ .

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN.** El promedio ( $\pm$  EE) de viabilidad espermática en el semen fresco fue del  $91 \pm 2$  % y no difirió del semen diluido (0, 2 y 4 de almacenamiento) ( $p > 0.05$ ). Para el sexto y octavo días de almacenamiento la viabilidad descendió de manera significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al día 0. La máxima movilidad progresiva ( $88 \pm 1.6$  %) se presentó en el semen fresco y la dilución (día 0) no afectó dicha movilidad. Sin embargo, a partir del segundo día de almacenamiento la movilidad descendió ( $p < 0.05$ ), llegando a su punto más bajo ( $63 \pm 1.6$  %) al octavo día ( $p < 0.0001$ ) (cuadro 1). En conjunto, éstos resultados indican que el diluyente Reading es capaz de mantener elevada la viabilidad espermática hasta el final del periodo de estudio y una movilidad progresiva dentro de los valores límites aceptables. Confirmándose que la reducción de la capacidad fertilizante del semen almacenado en Reading después de cinco días de almacenamiento, reportada por Revell y Glossop (1989), no puede ser atribuible a estas variables.

Por el contrario, el almacenamiento del semen a  $16^\circ\text{C}$  indujo cambios en el estado fisiológico de las membranas espermáticas. En efecto, en el semen fresco se observó  $4 \pm 0.7$  % de espermatozoides capacitados y la dilución del semen (día 0) o el almacenamiento por 2 días no afectaron este porcentaje. Sin embargo, al cuarto, sexto y octavo días de conservación hubo un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) y constante en el porcentaje de espermatozoides capacitados, siendo los valores de  $19 \pm 2.5$  %,  $29 \pm 2.9$  % y  $37 \pm 3.3$  %, respectivamente. No se encontró efecto de la dilución, ni del almacenamiento en la proporción de espermatozoides con RA ( $p > 0.05$ ) (cuadro 2). A la capacitación espermática por efecto del tiempo de almacenamiento, proponemos denominarla capacitación por almacenamiento, para distinguirla de la capacitación por incubación *in vitro* (Yanagimachi, 1994) y de la causada por otros procesos de manipulación (Maxwell y Johnson, 1997). Hasta donde sabemos, es la primera vez que se informa de este evento cuando el semen se almacena bajo las condiciones descritas. En conclusión, la conservación del semen a  $16^\circ\text{C}$  en un diluyente de larga duración (Reading) mantuvo un porcentaje elevado de viabilidad espermática y niveles aceptables de movilidad progresiva hasta final del periodo de almacenamiento, pero, indujo un incremento de la capacitación espermática a partir del cuarto día (capacitación por almacenamiento).

**IMPLICACIONES PRÁCTICAS.** Este incremento de la capacitación espermática por efecto del almacenamiento pudiera explicar la disminución de la capacidad fertilizante del semen porcino después del quinto día de almacenamiento. Se sabe que los espermatozoides capacitados, tienen un periodo de vida más corto que los no capacitados y a su vez, el de los reaccionados es todavía menor (Watson, 1996). Asimismo, muchos de los espermatozoides almacenados no son capaces de sobrevivir en el tracto genital de la hembra por un periodo 12 a 24 h en espera de que ocurra la ovulación (Waberski *et al*, 1994); lo cual podría deberse a que los espermatozoides capacitados son menos hábiles que los no capacitados para adherirse a las células del epitelio del oviducto y así prolongar su supervivencia (Fazeli *et al*, 1999; Petrunkina *et al* 2001). Consecuentemente, conforme aumenta la población de células capacitadas y reaccionadas, disminuirá la capacidad fertilizante de un eyaculado y viceversa. Si esto es correcto, el manejo del semen diluido en Reading, especialmente al sexto y octavo días de almacenamiento, debería ser similar al que se práctica con el semen congelado-descongelado; si esto no es así, no se

recomienda su uso. Ulteriores trabajos deberán confirmar si la capacitación por almacenamiento también se presenta en otros diluyentes de larga duración y cuales son los componentes del sistema de conservación que inducen estos cambios.

**REFERENCIAS.** Althouse GC, (1997). *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, 19: 777-782; Berger T. (1990). *Theriogenology*. 33:689-695; Conejo NJ *et al.* (1997). *Memoria 1er Curso Int. Reprod. Porcina*. 93-106; Fazeli A *et al.* (1999). *Biol. Reprod.* 60: 879-886; Fraser LR *et al.* (1990). *Mol. Reprod. Dev.* 40: 233-241; Johnson LA, *et al.* (1996). *Reprod. Dom. Anim.* 31: 37-47; Johnson LA, *et al.* (2000). *Anim. Reprod. Sci.* 62: 143-172; Mattioli G, (1996). *Theriogenology*. 45:373-381; Maxwell WMC, *et al.* (1997). *Mol. Reprod. Dev.* 46:408-418; Petrunkina AM, *et al.* (2001). *Reprod.* 122:469-480; Revell SG, *et al.* (1989). *Anim. Prod.* 84:579-584; Waberski D, *et al.* (1994); *Theriogenology*, 41: 1367-1377. Wang WH, *et al.* (1995). *J. Reprod. Fert.* 104: 305-313; Watson PF, (1996). *Reprod. Dom. Anim.* 31: 135-140; Yanagimachi, (1994). *The Phisiology Reproduction*, Edited by: Knobil E, Neill JD, 189-317.

CUADRO 1. EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DEL SEMEN PORCINO SOBRE LA VIABILIDAD ESPERMATICA Y LA MOVILIDAD PROGRESIVA (PROMEDIOS ± EE).

VARIABLE	SEMEN FRESCO	DIAS DE ALMACENAMIENTO				
		0	2	4	6	8
VIABILIDAD (%)	91.4±1.85 <sup>a</sup>	89.9±1.85 <sup>a</sup>	89.8±1.85 <sup>a</sup>	90.1±1.85 <sup>a</sup>	87.9±1.85 <sup>b</sup>	86.9±1.85 <sup>b</sup>
MOVILIDAD (%)	87.5±1.57 <sup>a</sup>	84.9±1.57 <sup>a</sup>	80.2±1.57 <sup>b</sup>	76.8±1.57 <sup>b</sup>	72.3±1.57 <sup>b</sup>	62.8±1.57 <sup>b</sup>

Letras distintas entre filas son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) con respecto al día 0.

CUADRO 2. EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO SOBRE EL ESTADO DE LA MEMBRANA EN ESPERMATOZOIDES PORCINOS VIVOS (% PROMEDIO ± EE).

ESTADO FUNCIONAL DE LA MEMBRANA	SEMEN FRESCO	DIAS DE ALMACENAMIENTO				
		0	2	4	6	8
NO CAPACITADO	84.2±2.04 <sup>a</sup>	85.2±1.1 <sup>a</sup>	77.6±1.91 <sup>a</sup>	66.6±2.99 <sup>b</sup>	55.5±4.61 <sup>b</sup>	41.9±6.13 <sup>b</sup>
CAPACITADO	4.3±0.73 <sup>a</sup>	4.8±0.91 <sup>a</sup>	10.7±1.81 <sup>a</sup>	18.7±2.46 <sup>b</sup>	28.8±2.85 <sup>b</sup>	37.2±3.29 <sup>b</sup>
RA	5.7±0.95 <sup>a</sup>	7.3±1.13 <sup>a</sup>	6.0±0.88 <sup>a</sup>	7.8±1.16 <sup>a</sup>	8.8±1.34 <sup>a</sup>	12.2±2.70 <sup>a</sup>

Letras distintas entre filas son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) con respecto al día 0.