

## Efecto de la temperatura y del tiempo de incubación sobre la evaluación de la integridad de la membrana en semen congelado de carnero

López, A<sup>2</sup>.; Söderquist, L<sup>1</sup>.; Rodríguez-Martínez, H<sup>1</sup>

### RESUMEN

La integridad de la membrana plasmática es un requisito imprescindible para la actividad normal del espermatozoide y muy especialmente para la fertilización. El acrosoma y la membrana plasmática del espermatozoide de carnero son las estructuras más dañadas por el proceso de congelación y descongelación. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del tiempo y de la temperatura de incubación, en la evaluación del daño de membrana en semen de carnero, utilizando los colorantes fluorescentes Calceína AM como marcador de esterasas citoplasmáticas permeante de la membrana, y homodímero de Etidio (CAM/Eth-1) como marcador de DNA no-permeante de la membrana. Esta técnica tiene la ventaja de que permite evaluar el porcentaje de espermatozoides con la membrana plasmática intacta y simultáneamente la movilidad espermática. Los resultados obtenidos indicaron que el daño de las membranas espermáticas se incrementó al elevar la temperatura de incubación, mientras que, a medida que el tiempo de incubación aumentó, disminuyó la movilidad espermática y se incrementó el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática dañada.

**Palabras clave:** semen, ovino, evaluación, integridad de membrana

### SUMMARY

The integrity of the sperm plasma membrane is an essential requirement for spermatozoa function and especially for fertilisation. Acrosome and plasma membrane of ram spermatozoa are the structures most damaged by freeze-thaw process. The aim of this study was determine the importance of time and temperature of incubation, in the evaluation of membrane damage with the fluorophore probes Calcein AM, a membrane-permeant cytoplasmatic esterase marker and Ethidium homodimer, a membrane-impermeant DNA marker (CAM/EthD-1). This technique has the advantage of enabling estimation of the proportion of spermatozoa with intact plasma lemmae as well as the proportion exhibiting motility. The results obtained show that high temperature increased spermatozoa damage meanwhile the longer the incubation time as greater the lost of motility and plasma membrane damage.

**Keywords:** semen, ram, evaluation, membrane integrity

### INTRODUCCIÓN

La evaluación *in vitro* de la calidad espermática se utiliza para obtener información de la capacidad fertilizante potencial del semen o del semental del cual fue colectado. La integridad de la membrana plasmática es un requisito imprescindible para la actividad normal del espermatozoide y muy especialmente para la fertilización (15). El desarrollo de la microscopía permitió utilizar diferentes técnicas para la evaluación de la morfología de la membrana celular, tales como: contraste de fases, interferencia, fluorescencia (15, 6). La utilización de fluorocromos en combinación con microscopio de luz ultravioleta ha demostrado ser una técnica muy adecuada para evaluar

la incidencia del daño de membrana en los espermatozoides (6, 3). Garner et al. describieron una técnica basada en la utilización de dos colorantes fluorescentes: diacetato de carboxifluoroscceína y yoduro de propidio para la evaluación de la integridad de membrana (2). Januskaukas y Rodríguez-Martínez trabajando con semen de toro y Althouse y Hopkins con semen de cerdo, describieron una técnica para evaluar el daño de membrana, utilizando los colorantes fluorescentes Calceína AM (que es un marcador de esterasas citoplasmáticas permeante de la membrana) y homodímero de Etidio (CAM/EthD-1) que tiene la ventaja de evaluar el porcentaje de espermatozoides con la membrana plasmática intacta

y simultáneamente la movilidad espermática (5, 1, 9).

El proceso de la conservación espermática causa serios daños a los espermatozoides de carnero, lo que determina bajos porcentajes de preñez (7, 10, 11). El acrosoma y la membrana plasmática del espermatozoide de carnero son las estructuras más dañadas por el proceso de congelación y descongelación (8, 13). Por esta razón, es de gran interés contar con una técnica *in vitro* para estimar el daño de los espermatozoides después de la congelación. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del tiempo y de la temperatura de incubación, en la evaluación del daño de membrana en se-

Recibido: 10/09/01 Aprobado: 01/04/02

<sup>1</sup>Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas, Uppsala, Suecia.

<sup>2</sup>Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; Email: alopezpe@yahoo.com

men de carnero, con la técnica de CAM/Eth-1.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales, colección del semen y diseño experimental

La primera parte del trabajo (recolección y congelación del semen) se realizó en la Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay (35° LS) durante la estación reproductiva (marzo). Se utilizaron tres carneros de la raza Merino, sexualmente maduros, previamente entrenados a servir la vagina artificial. Se colectaron tres eyaculados de cada carnero, utilizando el método de la vagina artificial, en tres semanas sucesivas. Inmediatamente después de cada colección se evaluó el volumen, la concentración espermática y la movilidad del eyaculado obtenido. Para la dilución se utilizó un diluyente en base a: Tris, glucosa y ácido cítrico con 20% de yema de huevo. Luego de la dilución, el semen fue enfriado hasta 5°C durante dos horas. A esta temperatura se completó la dilución utilizando el diluyente anteriormente descrito al que se le había agregado glicerol en cantidad suficiente para alcanzar 6% en la dilución final. El semen fue envasado en mini-pajuelas francesas (0.25 ml). Dos horas después del envasado, las pajuelas fueron congeladas a -160°C (3 cm por encima del nitrógeno líquido), durante 10 minutos y posteriormente sumergidas en nitrógeno, donde permanecieron almacenadas hasta su descongelación. La segunda parte del trabajo se realizó en el Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Facultad

de Veterinaria de la Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas en Uppsala, Suecia. Tres pajuelas de cada eyaculado fueron evaluadas después de su descongelación en agua a 50°C durante nueve segundos. Luego de la descongelación se tomaron alícuotas de cada pajuela y se procedió a evaluar la integridad de la membrana espermática utilizando dos temperaturas de incubación: 20°C y 35°C y tres tiempos de incubación: 15, 30 y 60 minutos.

### Evaluación de la integridad de la membrana espermática

La integridad de la membrana espermática, se evaluó incubando las muestras de semen en un medio de coloración que contenía Calceína AM (CAM), un marcador de esterasas citoplasmáticas permeante de la membrana, y homodímero de Ethidio (EthD-1), un marcador de DNA no-permeante de la membrana (Molecular Probes Inc. Oregon USA). Estos colorantes se prepararon en solución de buffer fosfato (PBS), tal como fue descrito por Januskauskas (4). El semen se diluyó 1/2 (v/v) en Tris buffer y 30µl de la dilución se mezclaron 1+1 con el medio de coloración y se incubaron en oscuridad a 20 y 35°C durante 15, 30 y 60 minutos. Se observaron diferentes campos seleccionados al azar en microscopio con platina caliente (37°C) con un aumento de 600x. En una muestra coloreada de 5ml fueron examinados cien espermatozoides y clasificados de acuerdo a lo descrito por Januskauskas y Rodríguez-Martínez (5) en cuatro grupos: verdes móviles (VM) espermatozoides

coloreados completamente de verde con CAM y móviles; verdes inmóviles (VI) espermatozoides con membrana plasmática intacta, coloreados de verde e inmóviles; verdes-rojos (VR) espermatozoides con la membrana plasmática dañada, pero el acrosoma intacto (verde) y la región post-acrosómica coloreada de rojo con EthD-1; rojos (R) espermatozoides con daño tanto en la membrana plasmática como en la acrosómica y completamente coloreados de rojo.

### Análisis estadístico

Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANVA) para medidas repetidas. Fueron estudiados los efectos de carnero, eyaculado, pajuela, temperatura de incubación, tiempo de incubación y la interacción entre tiempo de incubación y temperatura de incubación. Cuando los efectos principales fueron significativos, las medias individuales se compararon por el test de diferencia mínima significativa ( $P < 0.05$ ). Se estudiaron las correlaciones de Pearson entre las variables. Todos los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico SAS 608 (12). Los resultados se expresan como media  $\pm$  errores estandar de la media (e.e.m.)

### RESULTADOS

Los resultados del ANVA para las variables estudiadas se observan en el Cuadro 1. Las medias y e.e.m. de los porcentajes de espermatozoides rojos, rojos-verdes, verdes móviles y verdes inmóviles por eyaculado, temperatura de incubación, tiempo de incubación y pajuela se pre-

**Cuadro 1.** Resultados del Análisis de Varianza: niveles de significancia de los efectos estudiados.

	Grados de libertad	Espermat.rojos	Espermatozoides rojos-verdes	Espermatozoides verdes-inmóviles	Espermatozoides verdes-móviles
Carnero	2	***	***	***	***
Eyaculado	8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Pajuela	26	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Tiempo de incubación	1	n.s.	***	n.s.	***
Temperatura de incubación	2	***	***	n.s.	***
Tiempo*Temperatura	2	n.s.	*	n.s.	n.s.

\*:  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$

sentan en el Cuadro 2. Para facilitar la comprensión de los efectos de las temperaturas y de los tiempos de incubación, en la figura 1 se presentan juntos estos tratamientos sobre cada una de las variables de respuestas estudiadas.

El efecto de carnero influyó significativamente ( $P < 0.001$ ) a todas las variables estudiadas. El eyaculado y la pajueta no afectaron a ninguna de las variables estudiadas ( $P > 0.05$ ), indicando que el manejo durante la congelación fue similar en todos los casos y que la variación entre pajuelas del mismo eyaculado no fue estadísticamente apreciable. No se encontraron interacciones significativas entre temperatura y tiempo de incubación para las variables estudiadas, salvo para el porcentaje de espermatozoides verdes-rojos ( $P < 0.05$ ).

Una mayor temperatura de incubación ( $35^{\circ}\text{C}$ ) incrementó significativamente ( $P < 0.0001$ ) el porcentaje de espermatozoides dañados, incrementando los porcentajes de espermatozoides rojos es

decir espermatozoides con membranas plasmáticas y acrosómicas dañadas, y verdes-rojos. Además, redujo el porcentaje de espermatozoides verdes móviles ( $P < 0.0001$ ). A mayor tiempo de incubación disminuyó significativamente ( $P < 0.0001$ ) el porcentaje de espermatozoides verdes móviles e incrementó el porcentaje de espermatozoides rojos-verdes ( $P < 0.01$ ), es decir espermatozoides con daño en la membrana plasmática.

Los porcentajes de espermatozoides verdes móviles ( $P < 0.0006$ ), y espermatozoides verdes-rojos ( $P < 0.0001$ ) fueron afectados por el tiempo de incubación.

Las correlaciones entre las variables se presentan en el Cuadro 3.

### DISCUSIÓN

En el presente trabajo el daño de las membranas espermáticas se incrementó al elevar la temperatura de incubación, mientras que, a medida que el tiempo de incubación aumentó, disminuyó la movilidad espermática y se incrementó el porcen-

taje de espermatozoides con membrana plasmática dañada.

Las muestras incubadas a  $35^{\circ}\text{C}$  presentaron un mayor daño de las membranas plasmáticas (espermatozoides verde-rojos) y acrosómicas (espermatozoides rojos) que las muestras incubadas a  $20^{\circ}\text{C}$ , independientemente de los tiempos de incubación. Mientras tanto, mayores tiempos de incubación aumentaron el porcentaje de espermatozoides con la membrana plasmática dañada (espermatozoide verde-rojos) sin modificar el porcentaje de espermatozoides con ambas membranas dañadas (espermatozoides rojos). Zibrin *et al.* (16) utilizando microscopio de transmisión electrónica para evaluar semen de carnero diluido en citrato-yema y congelado, encontraron que el acrosoma era la estructura más dañada. Por su parte, Valcarce *et al.* (13) utilizando lectina marcada con isothiocianato y fluorosceína, y Hoetsch 33258 para evaluar semen de carnero congelado, observaron que el primer daño apre-

**Cuadro 2.** Porcentaje de espermatozoides rojos, verdes-rojos, verdes-inmóviles y verdes-móviles incubados a dos temperaturas diferentes ( $35^{\circ}\text{C}$  y  $20^{\circ}\text{C}$ ) y tres tiempos de incubación (15, 30, y 60 minutos)

Incubación x(%) eem	Esp. Rojos x(%) eem	Rojos-verdes x(%) eem	Verdes-inmóviles x(%) eem	Verdes-móviles x(%) eem
<b>Temperatura</b>				
20	54.1 ± 1.8 <sup>a</sup>	3.2 ± 0.4 a	22.4 ± 0.9	20.6 ± 1.5 <sup>a</sup>
35	58.5 ± 1.7 <sup>b</sup>	5.4 ± 0.5 b	21.5 ± 0.8	14.9 ± 1.5 <sup>b</sup>
<b>Tiempo</b>				
15	55.6 ± 2.4	2.1 ± 0.5a	21.8 ± 1.0	21 ± 2.1 <sup>a</sup>
30	57.1 ± 2.1	4.2 ± 0.5b	21.9 ± 1.1	17 ± 1.7 <sup>b</sup>
60	56.3 ± 2.0	6.7 ± 0.5c	22.0 ± 1.0	15 ± 1.8 <sup>b</sup>

Literales diferentes entre filas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ )

**Cuadro 3.** Correlaciones entre el porcentaje de espermatozoides rojos, verdes-rojos, verdes inmóviles y verdes móviles.

	Verdes-Rojos	Verde-Inmóvil	Verde- Móvil
Rojo	ns	- 0.56 0.0001	-0.82 0.0001
Rojo-verde		ns	0.36 0.0001
Verde-Inmóvil			ns

ciable luego del proceso de congelación-descongelación era en la membrana plasmática. En el presente trabajo, el daño provocado por los mayores tiempos de incubación estaría más asociado al daño de la membrana plasmática que al del acrosoma. Mientras que una mayor temperatura de incubación provocaría daño no solo en la membrana plasmática sino también en la membrana acrosómica. Es posible que el efecto sea, al menos par-

cialmente, debido a que las temperaturas elevadas incrementan el metabolismo espermático y por ende la concentración de catabolitos, incluyendo radicales libres los que causan daños en las membranas espermáticas (14).

Ambos factores, mayor temperatura y tiempo de incubación, provocaron una reducción de la movilidad espermática (espermatozoides verdes móviles) sin afectar el porcentaje de espermatozoides inmóviles pero con membranas intactas (verdes inmóviles). Es posible que

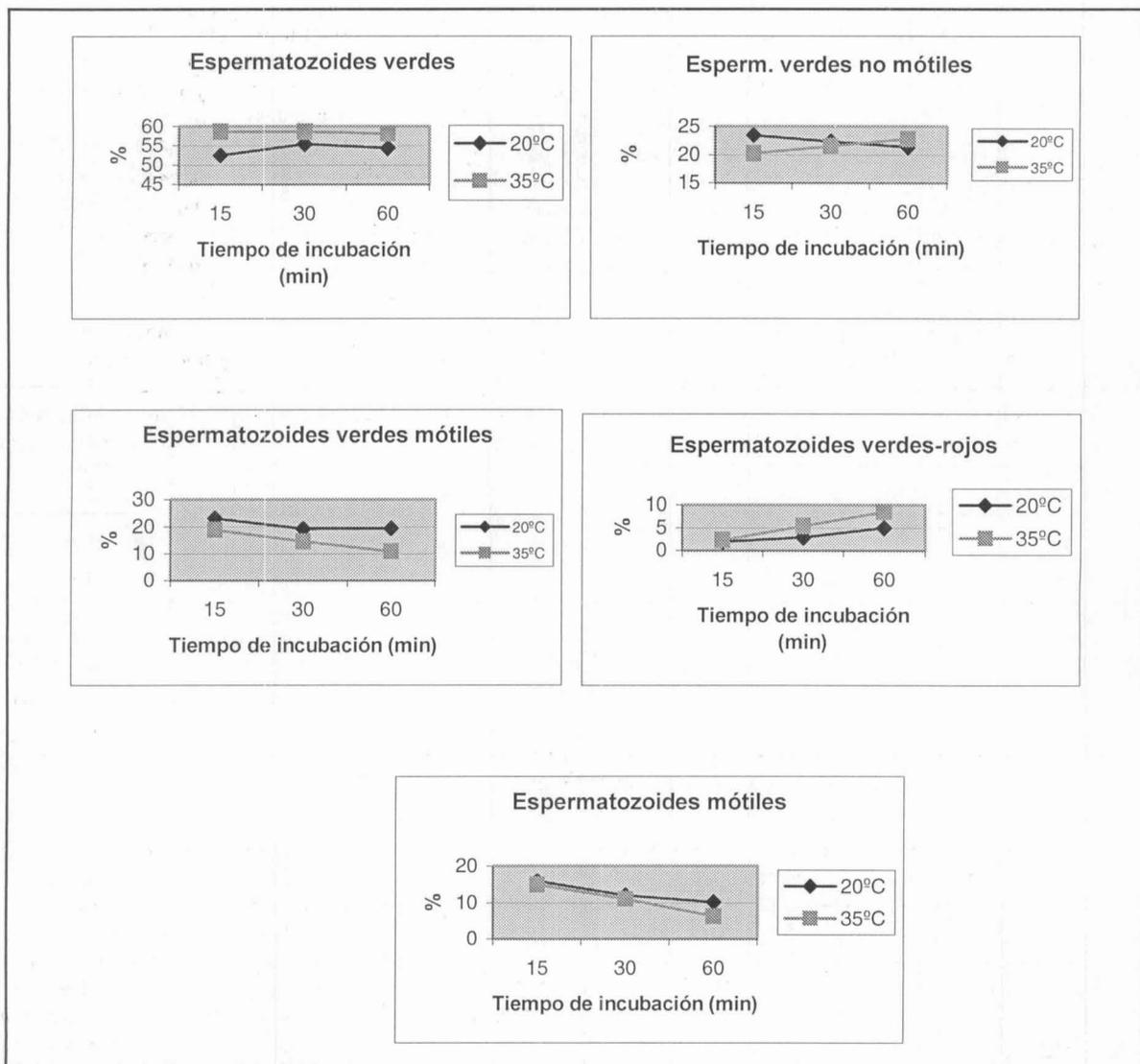
la pérdida de espermatozoides en esta última categoría debido al daño de las membranas plasmáticas, sea compensado por los espermatozoides que teniendo las membranas intactas pierden su movilidad.

Los resultados de este trabajo indican que cuando el semen de carnero es evaluado con CAM-EthD-1 debe considerarse que la incubación a 35°C produce mayor daño a los espermatozoides que la incubación a 20°C y que incubaciones durante 15 minutos producen menos cambios en la

viabilidad espermática que incubaciones más prolongadas.

### Agradecimientos

El Dr. Álvaro López recibió financiamiento para su pasantía en la Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas, de la Comisión Central de Investigaciones Científicas de la Universidad de la República (Uruguay).



Gráfica 1. Evolución de las distintas variables de sobrevivencia espermática evaluadas en función del tiempo y la temperatura de incubación.

## Referencias bibliográficas

1. **Althouse, G.C.; Hopkins S.M.** (1995). Assessment of boar sperm viability using a combination of two fluorophores. *Theriogenology*. 43:595-603.
2. **Garner, D.L.; Pinkel, D.; Johnson, L.A.; Cooke, Y.D.** (1986). Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol. Reprod.* 34:127-138.
3. **Harrison, R.A.P.; Vickers, S.E.** (1990). Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 88:343-352.
4. **Januskauskas, A.** (1995). Studies on the assessment of post-thaw sperm viability in Swedish dairy A.I. bulls. *Vet. Med. Lic. Thesis*, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suecia..
5. **Januskauskas, A.; Rodríguez-Martínez, H.** (1995). Assessment of sperm viability by measurement of ATP, membrane integrity and motility in frozen/thawed bull semen. *Acta vet. scand.*; 63:571-574.
6. **Johnson, L.A.; Maxwell, W.M.C.; Dobrinsky, J.R.; Welch, G.R.** (1996). Staining sperm for viability assessment. *Reprod. Dom. Anim.*; 31:37-47.
7. **Maxwell, W.M.C.; Watson, P.F.** (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 42:55-65.
8. **Nauck, V.A.** (1988). Structural and functional features of farm animals spermatozoa at cryopreservation. *International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 11<sup>th</sup>*, Dublin, Ireland. vol 3, 277.
9. **Rodríguez-Martínez, H.; Larsson, B.; Pertoft, H.** (1997). Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reprod. Fertil. Dev.* 9:297-308.
10. **Salamon, S.; Maxwell, W.M.C.** (1995a). Frozen storage of ram semen. I Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 37:185-249.
11. **Salamon S.; Maxwell W.M.C.** (1995b). Frozen storage of ram semen. II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim. Reprod. Sci.* 38:1-36
12. **Statistical Analysis System Institute** (1993). *SAS/STAT Guide for Personal Computers*, Version 6 ed., SAS Institute, Cary, NC.
13. **Valcarcel, A.; De Las Heras, M.A. de las; Pérez, L.; Moses, D.F.; Baldassarre, H.** (1996). Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing by simultaneous lectin-Hoechst 33258 staining. *Anim.Reprod. Sci.* 45:299-309.
14. **White, I.G.** (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5: 639-658.
15. **Woelders, H.** (1991). Overview of *in vitro* methods for evaluation of semen quality. *Reprod. Dom. Anim.*; Suppl 1 (Johnson, L A & Rath, D, eds), pp.145-164.
16. **Zibrin, M.; Belak, M.; Mesaros, P.; Gamcik, P.; Tomajkova, E.** (1987). The ultrastructure of frozen-thawed ram spermatozoa. *Zeitschrift fur Mikroskopisch Anatomische Forschung* 101: 904-912.

