

IDENTIFICACIÓN DEL ESTADO FUNCIONAL DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE DE GUAJOLOTE NATIVO DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN

DETERMINATION OF FUNCTIONAL STATUS OF PLASMATIC MEMBRANE IN NATIVE TURKEY DURING CRYOPRESERVATION PROCESS

Ochoa F.^{1*}, Val D.¹, Juárez A.¹, Toscano I.², Olivo I.², Conejo J.²

¹Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Km 9.5 carretera Morelia-Zinapécuaro, Michoacán, México. *fernando_8a60@hotmail.com

²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Km 9.5 carretera Morelia-Zinapécuaro, Michoacán, México.

Keywords: Native turkey; Cryopreserved Semen; CTC; Plasmatic membrane functional state.

Palabras claves: Guajolote nativo; Criopreservación de semen; CTC; Estado funcional de la membrana plasmática.

Abstract

Chlortetracycline fluorescence microscopy (CTC) is an efficient and practical method to study plasmatic membrane of mammals' sperm damage due to cryopreservation. However, this procedure has not been used to evaluate bird sperm. The objective of this study was to evaluate the functional state of plasmatic membrane in turkey sperm during cryopreservation process. It was collected ejaculated of six male in order to make a semen pool, later, the pool was diluted using a commercial extender with glycerol and processed using a slow frozen protocol. Through CTC the plasmatic membrane functional state was evaluated. Thirteen repetition from each stage of cryopreservation process were made: Fresh semen (SF), refrigerated semen (SR) and freeze-thawing semen (SC). The data obtained were sperm average of every 100 spermatozoa counted in each stage. The capacitated spermatozoa significantly increase as the frozen process was carried out, the values for SF, SR and SC treatments were 9.38, 17.92 and 24.16, respectively. Whereas low values of spermatozoa with acrosome reaction in treatments SF and SR were observed in regard to SC: 2.77, 3.85 and 39.38, respectively. CTC technique allowed to determine that freeze induce capacitation and acrosome reaction process.

Resumen

La microscopía de fluorescencia con clortetraciclina (CTC), es un método práctico y confiable para estudiar los posibles daños de la membrana plasmática por la congelación en los espermatozoides de mamífero. Sin embargo, este procedimiento no se ha utilizado para evaluar los espermatozoides de aves. El objetivo del trabajo fue, identificar el estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide de guajolote nativo, durante el proceso de criopreservación. Para cumplir con este objetivo se utilizaron 6 machos en edad reproductiva (12 meses de edad), evaluados previamente como aptos para la reproducción. Los machos se colectaron simultáneamente para la formación de un "pool" de semen, el cual se evaluó macroscópicamente (volumen, color e impurezas); posteriormente se diluyó en un extensor comercial con glicerol (1:4) y se procedió a la evaluación microscópica (motilidad progresiva, viabilidad, concentración y anomalías morfológicas). Una vez terminado el espermograma, se evaluó el estado funcional de la membrana plasmática mediante CTC. Ambas evaluaciones se realizaron durante las tres etapas de criopreservación: fresco (SF), refrigerado (SR) y descongelado (SC). Los datos se analizaron a través de un análisis de varianza de una vía y los promedios se compararon empleando la prueba estadística de Tukey. Se utilizó para tal efecto el programa SPSS® versión 16. Los valores para el SF, SR y SC fueron de 9.38, 17.92 y 24.16, respectivamente, mientras que los espermatozoides con reacción acrosomal presentaron valores bajos en el SF y el SR, con respecto al SC, de 2.77, 3.85 y 39.38 respectivamente. La técnica de CTC, permitió determinar que la congelación induce procesos de capacitación y reacción acrosomal. La congelación del semen de guajolote nativo en glicerol, produce un incremento de los espermatozoides con alteraciones en la membrana plasmática y de las anomalías morfológicas, así como, una marcada disminución de la movilidad (32.53) y de la viabilidad (53.46). Estos resultados indican que conforme transcurre el proceso de congelación, se incrementan las alteraciones en las

membranas del espermatozoide. Sin embargo, se logró conservar un promedio de 60.7 espermatozoides con capacidad fecundante después de la congelación.

Introducción

El proceso de congelación de semen aviar disminuye la fluidez de la membrana plasmática (Blesbois *et al.*, 2005); el contenido de sus carbohidratos (Long, 2006) daña mitocondrias y membrana acrosomal, así como el núcleo de los espermatozoides (Celeghini *et al.*, 2007), lo cual disminuye su fertilidad. Un método práctico y confiable para estudiar los posibles daños de la membrana plasmática por la congelación en los espermatozoides de mamífero es el empleo de la microscopía de fluorescencia con CTC. La técnica permite determinar el estado funcional de la membrana plasmática (no capacitación, capacitación y con reacción acrosomal) por los patrones de fluorescencia, que a su vez reflejan las alteraciones asociadas a los niveles del Ca²⁺ intra-citoplasmático (Curry, 2000). Sin embargo, este procedimiento no se ha utilizado para evaluar el espermatozoide de aves. El objetivo del trabajo fue identificar el estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide de guajolote nativo (GN), durante el proceso de criopreservación.

Material y métodos

Se recolectaron los eyaculados de 6 machos en edad reproductiva (12 meses), de manera simultánea, para formar un “pool” de semen, el cual se diluyó en un extensor comercial con glicerol, bajo un protocolo de congelación lento. Se evaluó la motilidad progresiva, viabilidad y anomalías morfológicas durante el proceso de congelación, según los procedimientos de Etches (1996). El estado funcional de la membrana plasmática en los espermatozoides de GN se determinó mediante CTC, siguiendo el procedimiento descrito por Conejo (2003). Todas las evaluaciones se realizaron durante las tres etapas del proceso de congelación: Semen fresco (SF), semen refrigerado (SR) y semen congelado-descongelado (SC). Se obtuvieron promedios de cada 100 espermatozoides contados por cada tratamiento en 13 repeticiones y se analizaron a través de un análisis de varianza de una vía; los promedios se compararon con la prueba estadística Tukey, con el programa SPSS® versión 16.

Resultados y discusión

Se encontró que la congelación disminuyó significativamente la viabilidad y motilidad espermática e incrementó las anomalías morfológicas ($p \leq 0.05$), tal como se muestra en la tabla I.

Tabla I. Promedios de viabilidad, motilidad y anomalías espermáticas en el semen fresco, refrigerado y congelado (n=13) [Average viability, motility and sperm abnormalities in fresh semen, refrigerated and frozen (n=13)]

Tratamiento	Viabilidad	Motilidad	Anormalidades morfológicas
SF	92,23 ^a	87,53 ^a	13,53 ^a
SR	85,15 ^b	67,69 ^b	16,92 ^a
SC	53,46 ^c	32,53 ^c	25,15 ^b

^{a b c} Literales distintas son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

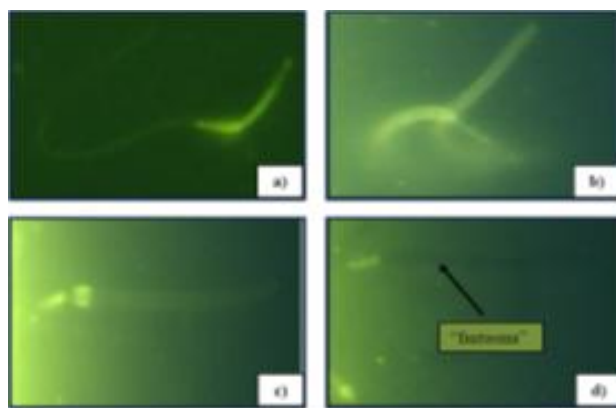


Figura 1. Patrones de tinción de los espermatozoides de GN teñidos con CTC (100 X). La flecha indica un espermatozoide reaccionado [Staining patterns of sperm of GN stained with CTC (100 X). The arrow indicates a sperm reacted]

Mediante microscopía de fluorescencia se determinaron cuatro patrones de tinción (figura 1):

1. Espermatozoides considerados como no capacitados
2. Espermatozoides en etapa de transición entre no capacitados y capacitados
3. Espermatozoides considerados como capacitados.
4. Espermatozoides considerados con reacción acrosomal (fantasmas).

Este análisis permitió determinar que la reacción acrosomal aumenta significativamente (39,3) en el SC, respecto al SF y el SR ($p \leq 0,05$) (tabla II). Sin embargo, se logró conservar un promedio de 60,7 espermatozoides con capacidad fecundante después de la congelación.

Tabla II. Promedios de espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados durante el proceso de congelación (n=13)[*Averages of untrained, trained and reacted during the freezing process sperm (n = 13)*]

Tratamiento	Patrones de tinción			
	A	B	C	D
SF	72,4 ^a	15,3 ^a	9,3 ^a	2,7 ^a
SR	57,8 ^b	20,3 ^a	17,9 ^b	3,8 ^a
SC	20,2 ^c	16,2 ^a	24,1 ^c	39,3 ^b

^{a b c} Literales distintas son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Conclusiones

La técnica de CTC es útil para determinar los cambios en la membrana plasmática del espermatozoide de GN durante el proceso de congelación, ya que permitió determinar que la congelación induce procesos de capacitación y reacción acrosomal.

Bibliografía

- Blesbois E., Grasseau I. & Seigneurin F. 2005. Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. *Reproduction* 129, 371–378.
- Celeghini E.C., Arruda R.P., Albuquerque R., Silva F.H.A., Faria D.E., Andrade AFC., Nascimento J. & Raphael C.F. 2007. Utilization of fluorescent probe association for simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes of rooster spermatozo. *Brazilian Journal of Poultry Science* 3, 143-149.
- Conejo N.J. 2003. Estado funcional de la membrana, capacitación in vitro, reacción acrosomal y capacidad de fertilización de espermatozoides porcinos almacenados en un diluyente de larga duración. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana. Xochimilco. México D.F.
- Curry M. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction* 5, 46-52.
- Etches R. 1996. The male. *Reproduction Poultry*. New York, USA: CAB International. 208-233.
- Long J. A. 2006. Avian Semen Cryopreservation: What Are the Biological Challenges? *Poultry Science* 85, 232–236.