



Universidad de Oviedo

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

**“Aplicación de plasma seminal de
verracos de alta y baja resistencia al
choque frío para mejorar la calidad
seminal post-descongelación”**

AUTORA:

Andrea Núñez González

TUTORES:

Felipe Martínez Pastor
Raúl González Urdiales

Junio 2018

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Hipótesis y objetivos	4
3. Materiales y metodologías	5
3.1. <i>Reactivos</i>	5
3.2. <i>Diseño experimental</i>	5
3.3. <i>Material biológico</i>	6
3.3.1. <i>Animales empleados</i>	6
3.3.2. <i>Recolección seminal</i>	6
3.4. <i>Experimento 1: test de resistencia al choque frío</i>	7
3.4.1. <i>Análisis de la movilidad espermática</i>	7
3.4.2. <i>Evaluación de la viabilidad espermática e integridad acrosomal</i>	9
3.5. <i>Clasificación de los machos y obtención de plasma seminal</i>	9
3.6. <i>Ensayo del efecto del PS en semen descongelado</i>	10
3.6.1. <i>Estudio de parámetros fisiológicos</i>	10
3.6.2. <i>Test de resistencia osmótica (ORT)</i>	11
3.7. <i>Análisis mediante citometría de flujo</i>	12
3.8. <i>Análisis de datos</i>	15
4. Resultados	15
4.1. <i>Test de resistencia al choque frío</i>	15
4.2. <i>Ensayo del efecto del PS en semen descongelado</i>	15
4.2.1. <i>Movilidad</i>	15
3.1.1. <i>Estudio de parámetros fisiológicos</i>	17
3.1.2. <i>Test de resistencia osmótica (ORT)</i>	20
5. Discusión	24
6. Conclusiones	27
7. Agradecimientos	27
8. Referencias bibliográficas	28

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- acr:** porcentaje de espermatozoides con daño acrosomal.
- acrviab:** porcentaje de espermatozoides viables con acrosomas dañados.
- ALH:** amplitud del movimiento lateral de cabeza.
- BCF:** frecuencia de batido.
- CASA:** análisis seminal computerizado.
- DU:** Duroc.
- FITC:** isotiocianato de fluoresceína.
- FSC:** *Forward Scatter*.
- H33342:** Hoechst 33342.
- IA:** inseminación artificial.
- INDEGSAL:** Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal de León.
- LD:** Landrace.
- LIN:** linealidad.
- LW:** Large White.
- M540:** merocianina 540.
- mot:** porcentaje de espermatozoides móviles.
- mot_c:** porcentaje de espermatozoides móviles tras estimulación con cafeína.
- MP:** motilidad progresiva.
- MT:** motilidad total.
- MTdr:** MitoTracker Deep Red.
- ORT:** test de resistencia osmótica.
- PI:** yoduro de propidio.
- PNA:** aglutinina de cacahuete.
- prog:** porcentaje de espermatozoides progresivos.
- PS:** plasma seminal.

PS_R: plasma seminal de machos altamente resistentes al choque frío.

PS_S: plasma seminal de machos altamente susceptibles al choque frío.

ROS: especies de oxígeno reactivo.

SEM: error estándar de la media.

SSC: *Side Scatter*.

STR: rectitud.

VAP: velocidad según la trayectoria suavizada.

VCL: velocidad según la trayectoria curvilínea.

viab: porcentaje de espermatozoides viables.

viab_c: porcentaje de espermatozoides viables tras estimulación con cafeína.

VSL: velocidad según la trayectoria rectilínea.

WOB: tambaleo.

1. Introducción

La industria porcina depende en gran medida de la generación de dosis seminales de verracos selectos y su aplicación mediante inseminación artificial (IA). Esta técnica se realiza principalmente por medio de la utilización de semen refrigerado, siendo el uso de semen congelado muy reducido en comparación (González Urdiales, 2011). La aplicación de semen criopreservado en los sistemas de producción haría posible la conservación a largo plazo de las dosis seminales, permitiendo programas de cría más flexibles y eficientes y ayudando también al control de la transmisión de patógenos (Yeste, 2017). Pese al gran número de ventajas que ello supondría, la criopreservación seminal en verraco produce aún resultados muy variables y resulta poco práctica en las condiciones actuales, ya que deriva en una disminución del porcentaje de partos obtenidos y de lechones nacidos, mayores costes y, en definitiva, un rendimiento productivo inferior (González Urdiales, 2011; Yeste, 2017). Es por ello que conseguir una mejora de la fertilidad o prolificidad del semen criopreservado en porcino resulta de gran importancia en este sector.

La criopreservación de espermatozoides implica la aparición de una serie de daños en la célula tales como alteraciones de la motilidad, alteraciones de las membranas plasmática y acrosomal, daños en la cromatina espermática y una disminución del potencial de membrana mitocondrial (Colás *et al.*, 2009; González Urdiales, 2011; Yeste, 2017) (**figura 1**). Estos daños están causados por el choque frío, el choque osmótico y el daño oxidativo inducido por especies de oxígeno reactivo (ROS) que van a sufrir los espermatozoides (González Urdiales, 2011; Fernández-Gago, Domínguez y Martínez-Pastor, 2013). En el caso de los mamíferos, especialmente del verraco, los espermatozoides parecen ser especialmente sensibles a estos cambios, debido a sus características físico-químicas. Concretamente, la mayor susceptibilidad de las células espermáticas de verraco a un descenso rápido de temperatura (choque frío) se debe a la composición lipídica de su membrana plasmática, que se caracteriza por un bajo contenido en colesterol y una alta proporción en sus fosfolípidos de ácidos grasos insaturados (González Urdiales, 2011; Fernández-Gago, Domínguez y Martínez-Pastor, 2013; Yeste, 2017).

Cabe destacar que las alteraciones que se observan cuando se somete a los espermatozoides a un choque frío no presentan la misma intensidad en todos los verracos, sino que existe una alta variabilidad individual (González Urdiales, 2011). Dicha variabilidad puede ser explicada por la existencia de diferencias intrínsecas a las membranas, que posiblemente modifiquen la funcionalidad de las mismas; pero también podría deberse a la acción de factores externos a las propias células, como el plasma seminal (Okazaki *et al.*, 2009; González Urdiales, 2011; Yeste, 2016). Thurston y colaboradores (2002), tras encontrar evidencias de la existencia de marcadores de congelabilidad del semen, concluyeron que cabía la posibilidad de que éstos estuvieran más relacionados con la composición del plasma seminal o con las funciones de las glándulas sexuales accesorias, que con la variabilidad en la bioquímica o en la fisiología espermática.

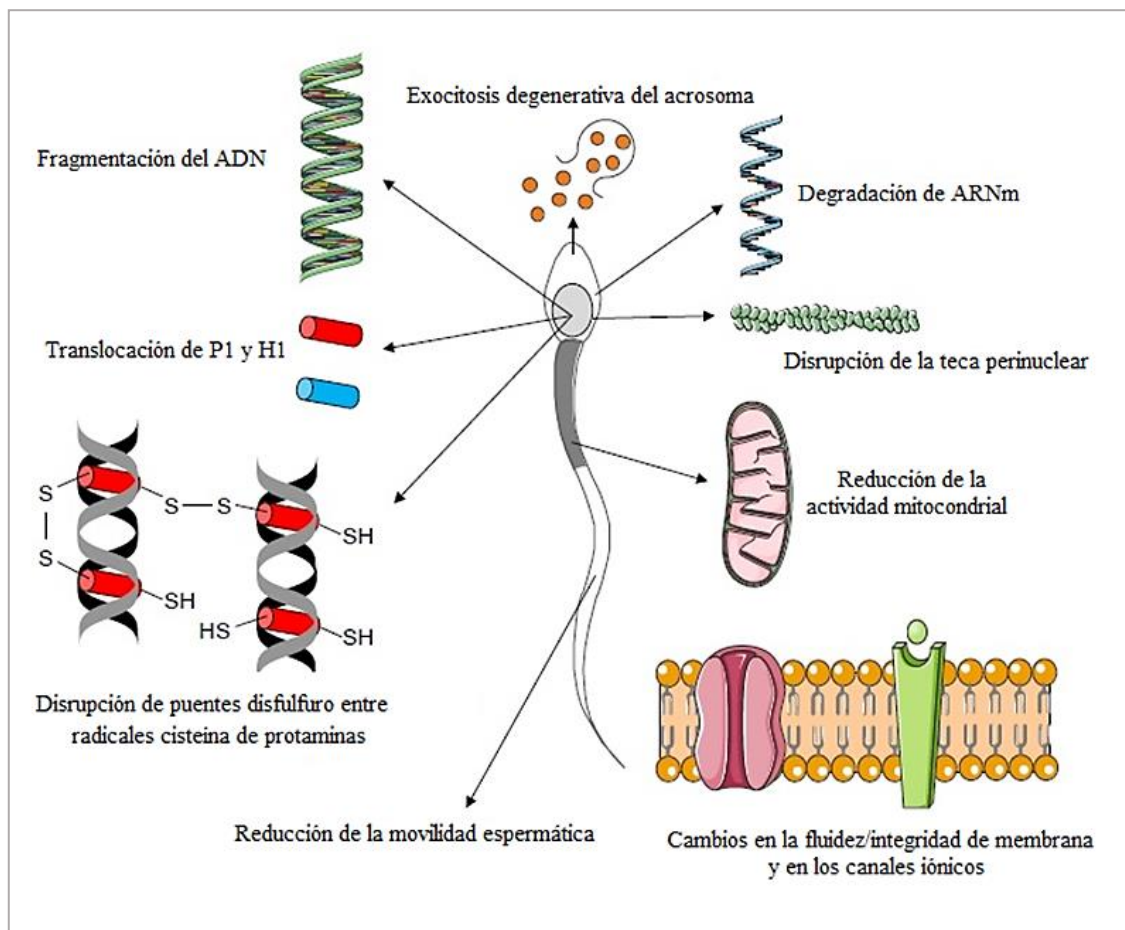


Figura 1. Principales daños inducidos por el proceso de criopreservación en los espermatozoides de verraco. Modificado de: Yeste (2017).

El plasma seminal (PS), un conjunto de secreciones fisiológicas de distintas glándulas del tracto reproductor masculino, es el medio natural en el que se encuentran los espermatozoides en el eyaculado. Contiene una amplia variedad de factores, principalmente proteínas, que desempeñan un importante papel en el mantenimiento de la viabilidad de los espermatozoides y la modulación de su fisiología, además de participar en la regulación de la respuesta del tracto genital femenino a la presencia de estas células (Caballero *et al.*, 2008; Colás *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011; Fernández-Gago *et al.*, 2017). Aunque muchos de los componentes del PS son fundamentales para el proceso de fecundación natural, a menudo son perjudiciales en la aplicación de las técnicas de reproducción asistida, por lo que en la mayoría de los casos el PS es eliminado, y las muestras seminales se diluyen en distintos medios para su uso (Okazaki *et al.*, 2009; Fernández-Gago *et al.*, 2017). Sin embargo, numerosos estudios parecen indicar que su aplicación podría ayudar a mejorar la calidad seminal tras los procesos de congelación y descongelación (Pursel, Johnson y Schulman, 1973; Barrios *et al.*, 2000; Vadnais *et al.*, 2005; Caballero *et al.*, 2008; Okazaki *et al.*, 2009; González Urdiales, 2011; Fernández-Gago, Domínguez y Martínez-Pastor, 2013; Torres *et al.*, 2016; Fernández-Gago *et al.*, 2017).

En el caso de los espermatozoides de verraco, distintos estudios indican que la incubación de espermatozoides descongelados con PS produce una mejora de ciertos parámetros espermáticos, ayudando a mantener la motilidad (Okazaki *et al.*, 2009; González Urdiales, 2011; Fernández-Gago *et al.*, 2017), previniendo la aparición de alteraciones en la cromatina (Fernández-Gago *et al.*, 2017), retrasando el aumento de ROS (Fernández-Gago, Domínguez y Martínez-Pastor, 2013), previniendo y/o revirtiendo los cambios relacionados con la criocapacitación (Vadnais *et al.*, 2005; Fernández-Gago, Domínguez y Martínez-Pastor, 2013; Torres *et al.*, 2016; Fernández-Gago *et al.*, 2017), mejorando la integridad de membrana y acrosomal (Pursel, Johnson y Schulman, 1973; Barrios *et al.*, 2000; González Urdiales, 2011; Fernández-Gago, Domínguez y Martínez-Pastor, 2013) e incluso mejorando las tasas de fecundación (Fernández-Gago, Domínguez y Martínez-Pastor, 2013; Fernández-Gago *et al.*, 2017). No obstante, otros estudios en mamíferos muestran que la aplicación de PS tiene poco o nulo efecto sobre la movilidad de los espermatozoides o su susceptibilidad al choque frío, pudiendo incluso inducir efectos perjudiciales sobre la motilidad, la viabilidad y la

supervivencia post-descongelación de las células espermáticas (Barrios *et al.*, 2000; Fernández-Gago, Domínguez y Martínez-Pastor, 2013; Torres *et al.*, 2016). Estas contradicciones se pueden deber a que el PS es una mezcla compleja cuya composición es altamente variable, de manera que la presencia, ausencia y concentración de sus distintos componentes varía entre especies, razas e individuos (Caballero *et al.*, 2008; Fernández-Gago, Domínguez y Martínez-Pastor, 2013).

En consonancia con este razonamiento, estudios como el de Hernández y colaboradores (2007) muestran que la adición de PS de eyaculados procedentes de individuos “buenos congeladores” incrementa tanto la calidad de las muestras descongeladas como el porcentaje de ovocitos penetrados y polispermicos en mayor medida que el PS procedente de eyaculados “de malos congeladores”.

2. Hipótesis y objetivos

El presente trabajo se plantea como parte de un estudio que está realizando el Centro de Selección Porcina de Campo de Villavidel, gestionado por AIM Ibérica, junto con el grupo IMAPOR del Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal de León (INDEGSAL), para incrementar la calidad de semen criopreservado de cerdos de alta calidad genética. Una de las líneas de trabajo se centra en estudiar los efectos de suplementar dosis seminales descongeladas de verraco con PS de distintos machos, presumiendo que los efectos van a depender del macho del que se obtenga este PS. Continuando con dicha línea de investigación, nuestra hipótesis de trabajo es que la suplementación del semen descongelado con PS de cerdos resistentes al choque frío mejoraría la motilidad espermática y los parámetros de viabilidad post-descongelación.

En este contexto, el objetivo de este estudio es comprobar el efecto del PS de machos productores de semen con alta y baja resistencia al choque frío, en cuanto a su eficacia para mantener la calidad de los espermatozoides descongelados. Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Clasificar los machos en productores de semen resistente o susceptible al choque frío. Con este fin se evaluaron los parámetros de movilidad, viabilidad e integridad acrosomal de muestras seminales de distintos machos tras someterlas a un choque frío.

2. Obtener plasma seminal de los machos con resultados más extremos en el Objetivo 1 para formar dos lotes: uno integrado por plasma seminal procedente de machos altamente resistentes al choque frío (PS_R) y otro formado por plasma seminal de machos altamente susceptibles a dicho proceso (PS_S).
3. Evaluar la eficacia de los distintos lotes de plasma seminal (PS_R y PS_S) en semen descongelado: estudio de la movilidad espermática y parámetros fisiológicos del espermatozoide (viabilidad, capacitación, integridad acrosomal, actividad mitocondrial y apoptosis) por medio de citometría de flujo.

3. Materiales y metodologías

3.1. Reactivos

Todos los compuestos utilizados se compraron a Sigma-Aldrich (Madrid, España) excepto aquellos de los que se especifique lo contrario.

3.2. Diseño experimental

Este trabajo se puede subdividir en tres fases:

1. Test de resistencia al choque frío: a realizar en dosis seminales producidas rutinariamente en el centro. Se mantuvieron las dosis seminales refrigeradas (20 °C) durante cinco horas. Se pasó 1 mL de cada muestra a un baño de agua-etanol a 0 °C durante 5 min y, al cabo de ese tiempo, se evaluó la movilidad espermática con y sin estimulación con cafeína (1 mM), además de la viabilidad y la integridad acrosomal de los espermatozoides.
2. Clasificación de los machos en función de su susceptibilidad al choque frío y obtención de plasma seminal: análisis de los datos y obtención del PS de los machos considerados más resistentes y más susceptibles. Se utilizó un análisis de clusters para clasificar a los animales en función de los resultados de susceptibilidad al choque frío. Aquellos clasificados en los grupos considerados más extremos fueron seleccionados y de ellos se obtuvo semen, que fue centrifugado para obtener el PS. El PS obtenido fue mezclado en dos *pools* (“resistente” y “susceptible”), alicuotado y almacenado a -80 °C.
3. Ensayo del efecto del PS en semen descongelado: se descongelaron dosis seminales de 6 machos, mezclándose para cada uno de los machos el contenido de dos dosis. A

continuación, fueron alicuotadas en tres tubos: suplementando con un 20 % de PS “resistente” o “susceptible”, o con medio MR-A sin PS. Todos los tubos se incubaron a 37 °C, y fueron analizados (movilidad y parámetros fisiológicos mediante citometría de flujo) cada dos horas durante cuatro horas.

3.3. *Material biológico*

3.3.1. *Animales empleados*

Los animales empleados proceden del Centro de Selección Porcina de Campo de Villavidel (León), gestionado por AIM Ibérica, donde son utilizados asiduamente para la elaboración de dosis seminales con fines comerciales.

Para las pruebas experimentales se utilizaron muestras seminales obtenidas a partir de eyaculados procedentes de 63 verracos de las razas Large White (LW), Landrace (LD), Duroc (DU) y razas sintéticas, escogidos al azar de entre los animales del centro. Las extracciones fueron realizadas entre los meses de marzo y mayo de 2018.

En el momento del experimento, los animales contaban con una edad comprendida entre los 12 y los 22 meses, y se sometían a extracciones seminales semanales. En el centro, los verracos se alojan en corrales individuales de 6,25 m² de superficie, con una alimentación de 2,5 – 3 kg de pienso compuesto C7 de Uvesa, administrado en una sola toma al día, y suministro de agua *ad libitum*. Los animales se mantienen en un recinto de condiciones controladas, a una temperatura regulada de entre 18 y 23 °C, y ciclos de horas de luz:oscuridad de 12:12. Son sometidos periódicamente a cuidados sanitarios preventivos, consistentes en la realización de desparasitaciones con moxidectina cada tres meses y en la administración mensual de un probiótico lácteo durante cinco días y de un complejo vitamínico cada dos meses, a excepción de la época estival en la que se suministra una vez al mes.

3.3.2. *Recolección seminal*

La recolección del semen se realiza sobre maniqués de colección fijos de acero recubiertos de un material plástico (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania), en salas de extracción higiénicas, mediante la técnica de la mano enguantada (Hancock y Howell, 1959). Previamente se realiza un vaciado de la cavidad prepucial y una limpieza de la zona prepucial externa con una solución de cloruro de benzalconio al 2 %. Se aprovecha

únicamente la fracción rica del eyaculado, gracias a la colección mediante bolsas con filtro US-Bag (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania). Dichas bolsas se colocan dentro de una jarra termo (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania) con 100 mL de diluyente MR-A (Kubus S.A., Madrid) a 37 °C, permaneciendo a esta temperatura en una estufa Function Line (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Alemania) hasta el momento de la extracción. Tras la recogida, se desecha el filtro y acto seguido se pasa la bolsa al laboratorio para su valoración rutinaria.

De los eyaculados seleccionados, se tomaron alícuotas de 10 mL y se mantuvieron refrigeradas a 20 °C en una estufa IF450 (Mettler GmbH + Co. KG, Schwabach, Alemania) hasta el momento de realización de los ensayos.

3.4. Experimento 1: test de resistencia al choque frío

Con el fin de facilitar su análisis, esta prueba fue realizada en tandas de 5 muestras seminales. Transcurridas cinco horas tras la obtención del semen, la muestra procedente de cada uno de los machos fue diluida hasta una concentración final de 50×10^6 células/mL en 1 mL de MR-A, en un microtubo Eppendorf de 1,5 mL. Inmediatamente después de la dilución, los microtubos se sumergieron durante 5 min en un baño de agua-etanol (1:1), mantenido a 0 °C en una caja de poliestireno expandido. A continuación, se retiraron del baño, y de cada uno de ellos se derivaron 250 µL de muestra para la valoración de la movilidad espermática sin cafeína, y otros 250 µL para la valoración de la movilidad espermática previa incubación con cafeína. El volumen restante se utilizó para la valoración de la viabilidad e integridad acrosomal de los espermatozoides mediante citometría de flujo (**figura 2**).

3.4.1. Análisis de la movilidad espermática

Se diluyeron las muestras seminales hasta una concentración de 25×10^6 espermatozoides/mL en medio MR-A. En el caso de las muestras reservadas para su análisis con estimulación por cafeína, se realizó el mismo procedimiento pero utilizando en su lugar el diluyente enriquecido con una concentración de cafeína de 2 mM, de forma que la concentración final de cafeína es 1 mM. A continuación, se incubaron los microtubos con las muestras seminales diluidas en un termobloque Eppendorf ThermoMixer® a 39 °C durante 6 min, tras lo cual se homogeneizaron, y se depositaron 4 µL en una cámara de recuento Makler (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel),

también atemperada a 39 °C sobre una placa termocalefactada HT200 (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania).

Se evaluó la motilidad de las muestras por medio de un sistema de análisis seminal computerizado (CASA), utilizando un microscopio Nikon Eclipse E400 (Tohigi, Japón) equipado con una óptica de contraste de fase negativo y platina térmica y acoplado a una cámara digital Basler A312fc (Basler AG, Vision Technologies, Ahrensburg, Alemania). Para la captura de imágenes se utilizó una magnificación de 10 aumentos, adquiriéndose un mínimo de 200 células por muestra. El análisis se realizó por medio del software ISAS® v. 1.2. (Integrated Semen Analysis System, PROiSER R +D, Paterna, España), utilizando los siguientes parámetros de configuración:

- Número de imágenes analizadas: 53.
- Frecuencia de adquisición: 53 imágenes s⁻¹.
- Tiempo de captura: 1 s.
- Umbral mínimo/máximo del área de las partículas para ser consideradas como espermatozoides: 20–80 μm².
- Radio de búsqueda: 11 μm.
- Número mínimo de imágenes por espermatozoide para el cálculo de ALH: 7.
- inmóviles < 10 μm/s < lentos < 25 μm/s < medios < 45 μm/s < rápidos.

Si bien el cómputo de los espermatozoides y sus trayectorias se efectúa automáticamente, se realizó a posteriori una corrección manual a fin de eliminar partículas no espermáticas consideradas como tal por el software, espermatozoides erróneamente detectados como móviles o como inmóviles, o trayectorias incompletas o equivocadas.

Para cada uno de los espermatozoides analizados, el software proporciona el porcentaje de espermatozoides con movilidad total (MT, %) y progresiva (MP, %), así como tres parámetros de velocidad: velocidad según la trayectoria curvilínea (VCL, μm/s), velocidad según la trayectoria suavizada (VAP, μm/s) y velocidad según la trayectoria rectilínea (VSL, μm/s). Se obtiene además la amplitud del movimiento lateral de la cabeza (ALH, μm) y la frecuencia de cruce de batido (BCF, Hz), junto con tres parámetros de linealidad del recorrido: linealidad, (LIN, %), que hace referencia a la relación VSL/VCL; rectitud (STR, %), definida como la relación VSL/VAP y tambaleo

(WOB, %), que es una medida de la oscilación de la trayectoria respecto a la trayectoria media (VAP/VCL).

3.4.2. *Evaluación de la viabilidad espermática e integridad acrosomal*

La aglutinina de cacahuete (PNA) tiene la capacidad de unirse a los residuos de galactosa de la cara interna de la membrana externa acrosomal de los espermatozoides. Combinada con isotiocianato de fluoresceína (FITC), permite marcar los espermatozoides con acrosomas dañados. El yoduro de propidio (PI) es capaz de penetrar en las membranas plasmáticas dañadas, permitiendo identificar células muertas o en proceso de degeneración.

Para evaluar la viabilidad celular (integridad de membrana) y el estatus del acrosoma de los espermatozoides tras el choque frío, se empleó una tinción de PNA-FITC (Sigma Aldrich, L-7381) y PI (Sigma-Aldrich, P-4170). La tinción se realizó diluyendo la muestra reservada para este análisis hasta 2×10^6 espermatozoides/mL en un volumen final de 300 μ L de MR-A con 0,3 μ g/mL de PNA-FITC y una concentración 1,5 mM de PI. Tras 15 minutos de incubación a 37 °C en oscuridad, se realizó el análisis por medio de citometría de flujo, el cual permite diferenciar cuatro subpoblaciones celulares: PI+/PNA-FITC- (espermatozoides no viables), PI-/PNA-FITC+ (espermatozoides viables con el acrosoma dañado), PI+/PNA-FITC+ (espermatozoides no viables, acrosoma dañado) y PI-/PNA-FITC- (espermatozoides viables, acrosoma intacto).

3.5. *Clasificación de los machos y obtención de plasma seminal*

Los machos sometidos al test de resistencia al choque frío fueron clasificados en función de los resultados obtenidos tras la prueba (ver apartado 3.8). Se seleccionaron 4 machos de entre los clasificados como altamente resistentes y 4 machos clasificados como susceptibles al choque frío.

El plasma seminal de cada uno de los verracos seleccionados fue obtenido tras una centrifugación doble a $800 \times g$ durante 10 min del eyaculado correspondiente, y se almacenó a -20 °C hasta su uso. La descongelación del plasma seminal de cada macho se realizó en hielo, tras lo cual fue sometido a una tercera centrifugación ($100 \times g$, 10 min). Se prepararon dos *pools* seminales: uno derivado del PS de los machos clasificados como “resistentes” (PS_R), y otro derivado del PS de los machos clasificados como

“susceptibles” (PS_S). Ambos se mantuvieron a 4 °C durante la realización de los ensayos pertinentes.

3.6. Ensayo del efecto del PS en semen descongelado

Se utilizaron dosis seminales congeladas procedentes del criobanco de INDEGSAL de seis machos (razas DU, LD y sintéticas) cuyo semen descongelado presentaba, según los registros del criobanco, buenos parámetros de movilidad.

En cada sesión experimental, se descongelaron dos pajuelas procedentes del mismo macho mediante su inmersión en un baño termostático de agua a 50 °C durante 12 s y se combinó su contenido. A continuación, la muestra seminal fue diluida hasta una concentración de 50×10^6 espermatozoides/mL en medio MR-A suplementado en un 20 % de PS_R, en MR-A suplementado en un 20 % con PS_S, y en medio MR-A sin suplementar (control). Las muestras se mantuvieron a 20 °C para su análisis tras 0, 2 y 4 horas de incubación con el plasma seminal. En cada punto de muestreo, se evaluó tanto la movilidad espermática (ver apartado 3.4.1.), como la resistencia osmótica de los espermatozoides (test ORT), además de una serie parámetros fisiológicos por medio de citometría de flujo: integridad de la membrana plasmática, daño acrosomal, apoptosis, actividad mitocondrial y capacitación (**figura 3**).

3.6.1. Estudio de parámetros fisiológicos

Por una parte, se realizó una evaluación de la viabilidad espermática y de la integridad acrosomal, utilizando los fluorocromos PI y PNA-FITC, en las tres condiciones experimentales y a cada uno de los tiempos indicados. Dicho análisis se llevó a cabo tal y como se detalla en el apartado 3.4.2.

Por otro lado, con el fin de evaluar viabilidad celular, apoptosis, función mitocondrial y capacitación de los espermatozoides, se empleó una tinción con los fluorocromos Hoechst 33342 (H33342), YO-PRO-1 (Invitrogen, Carlsbad, California, EE. UU.), merocianina 540 (M540), PI y MitoTracker™ Deep Red (MTdr) (Invitrogen, Carlsbad, California, EE. UU.). Dicha tinción se llevó a cabo diluyendo la muestra reservada para este análisis hasta 2×10^6 espermatozoides/mL en un volumen final de 300 µL de MR-A con una concentración 14,8 µM de H33342, 4,3 nM de YO-PRO-1, 1,3 µM de M540, 1 µM de PI y 33,3 nM de MTdr. Las muestras fueron incubadas durante

15 minutos a 37 °C en oscuridad, tras lo cual se analizaron por medio de citometría de flujo.

Los fluorocromos PI y YO-PRO-1 permiten evaluar apoptosis: mientras que el PI tiñe células muertas, el YO-PRO-1 es capaz de atravesar la membrana plasmática de espermatozoides apoptóticos que se mantienen impermeables al PI, permitiendo su marcaje. Este marcaje nos va a permitir discriminar distintas poblaciones espermáticas: espermatozoides vivos (negativa para ambos fluorocromos), necróticos (positiva para ambos fluorocromos) y apoptóticos (positiva únicamente para el YO-PRO1).

La merocianina 540 es un fluorocromo capaz de unirse de forma preferencial a membranas celulares con un alto desorden de lípidos, característica que se aprovecha para su uso en el marcaje e identificación de espermatozoides capacitados (con marcaje positivo para este fluorocromo).

El MitoTracker™ Deep Red resulta de gran utilidad para la determinación del estatus funcional de las mitocondrias de los espermatozoides, ya que es capaz de atravesar la membrana plasmática del espermatozoide mediante difusión pasiva, uniéndose a las mitocondrias y emitiendo una fluorescencia que permite detectar espermatozoides vivos con mitocondrias activas.

3.6.2. Test de resistencia osmótica (ORT)

El test de resistencia osmótica (ORT) fue desarrollado a partir de los trabajos de Schilling, Vengust y Smidt (1984) para la evaluación de la capacidad de conservación del semen porcino a las temperaturas de refrigeración, basándose en la determinación de la resistencia de las membranas acrosomales del espermatozoide tras un estrés inducido por la incubación de las células en condiciones hipoosmóticas. La resistencia al estrés osmótico de una célula se define a través de dos relaciones: ratio de viabilidad y ratio de espermatozoides con acrosomas intactos (Yeste *et al.*, 2010). En ambos casos, el ratio se obtiene al dividir el valor de la variable tras el tratamiento osmótico, por el valor de la misma en condiciones iso-osmóticas.

Para la realización de esta prueba, se incubaron 40 µL de muestra seminal en 400 µL de una solución de MR-A hipoosmótica (150 mOsm/kg) a 37 °C durante 15 min. A continuación, se evaluaron los parámetros de viabilidad e integridad acrosomal por medio de una tinción PNA-FITC y PI, diluyendo la muestra hasta una concentración de

$1,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL en un volumen final de 200 μ L de MR-A con una concentración 14,8 μ M de H33342, 0,3 μ g/mL de PNA-FITC y 1 μ M de PI, e incubándola en la tinción durante 15 min. Transcurrido este tiempo, se procedió a su análisis inmediato por medio de citometría de flujo, utilizando los parámetros de configuración descritos anteriormente.

3.7. Análisis mediante citometría de flujo

Los análisis por citometría de flujo se llevaron a cabo utilizando dos citómetros de flujo diferentes.

Para los análisis relativos al choque frío se utilizó un citómetro de flujo BD FACScalibur™ (Becton Dickinson Immunochemistry Systems, San José, CA, EE. UU.) equipado con un láser de Argón configurado a 488 nm. La fluorescencia emitida por el PNA-FITC fue analizada con el fotodetector FL1 (filtro 530/28BP) y la fluorescencia del PI en el fotodetector FL3 (filtro 670LP). Para la adquisición de los datos se utilizó el software Cell Quest Pro v. 3.1 (BD Biosciences), adquiriéndose 10.000 eventos por muestra.

El resto de análisis fueron realizados utilizando un citómetro de flujo MACSQuant® Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) equipado con tres láseres de excitación: violeta (405 nm), azul (488 nm) y rojo (635 nm). Para el análisis de las distintas fluorescencias emitidas se utilizaron los siguientes fotodetectores: B1 para el PNA-FITC (filtro 525/50 nm), B2 (filtro 585/40 nm) para la M540, B3 (filtro 655–730 nm) para el PI, V1 (filtro 450/50 nm) para el H33342 y R1 (filtro 655–730 nm) para el MTdr. Se utilizó el software MACSQuantify™ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) integrado en el propio citómetro para la adquisición de los datos, con un mínimo de 10.000 eventos adquiridos por muestra.

El análisis de los datos se llevó a cabo por medio del software Weasel v. 3.4.2 (The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Victoria, Australia). Se utilizaron las señales las señales FSC (*Forward Scatter*), SSC (*Side Scatter*) y la señal positiva para H33342 para discriminar la población espermática, excluyéndose agregados celulares y otros eventos no deseados.

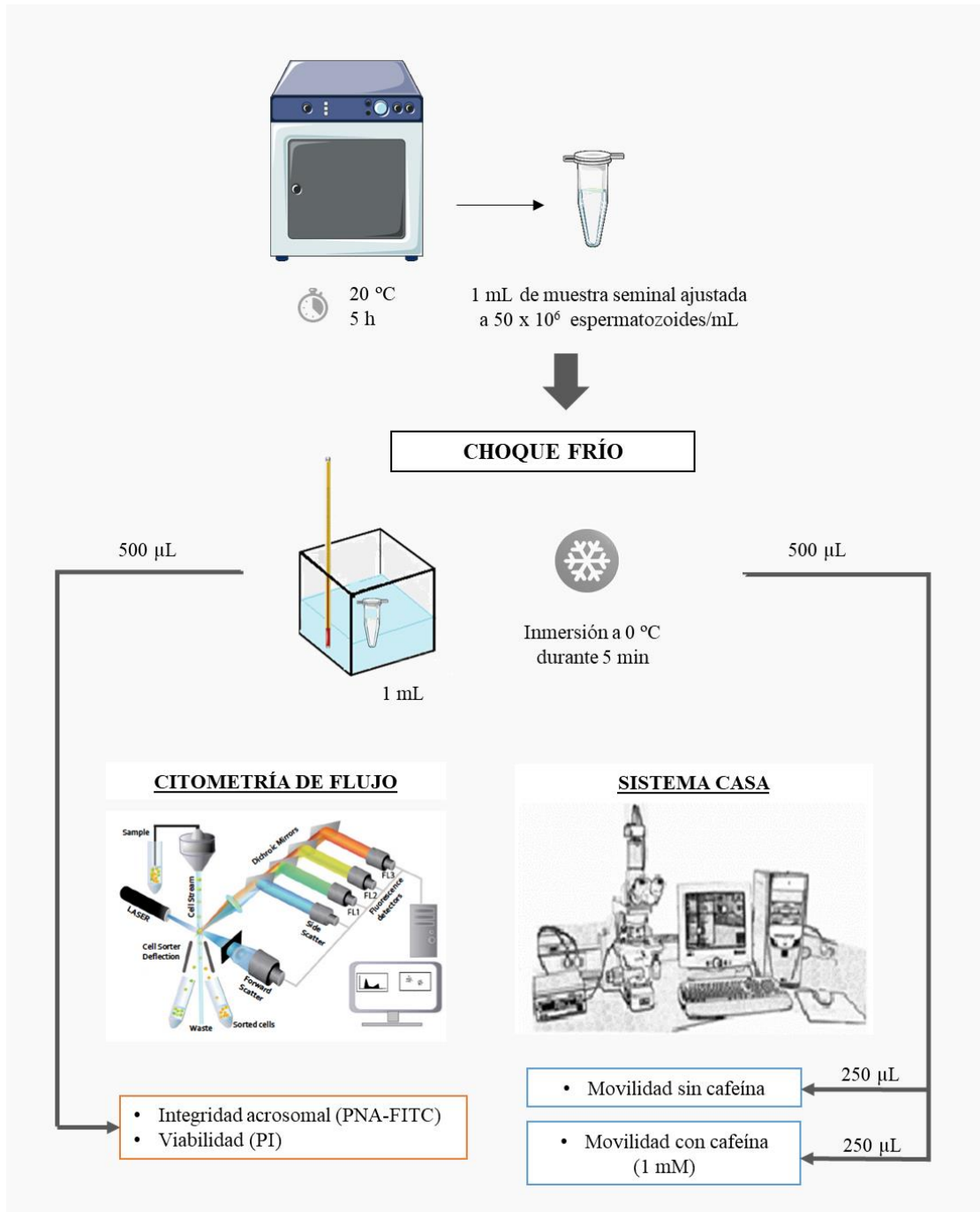


Figura 2. Representación esquemática de la prueba de resistencia al choque frío.

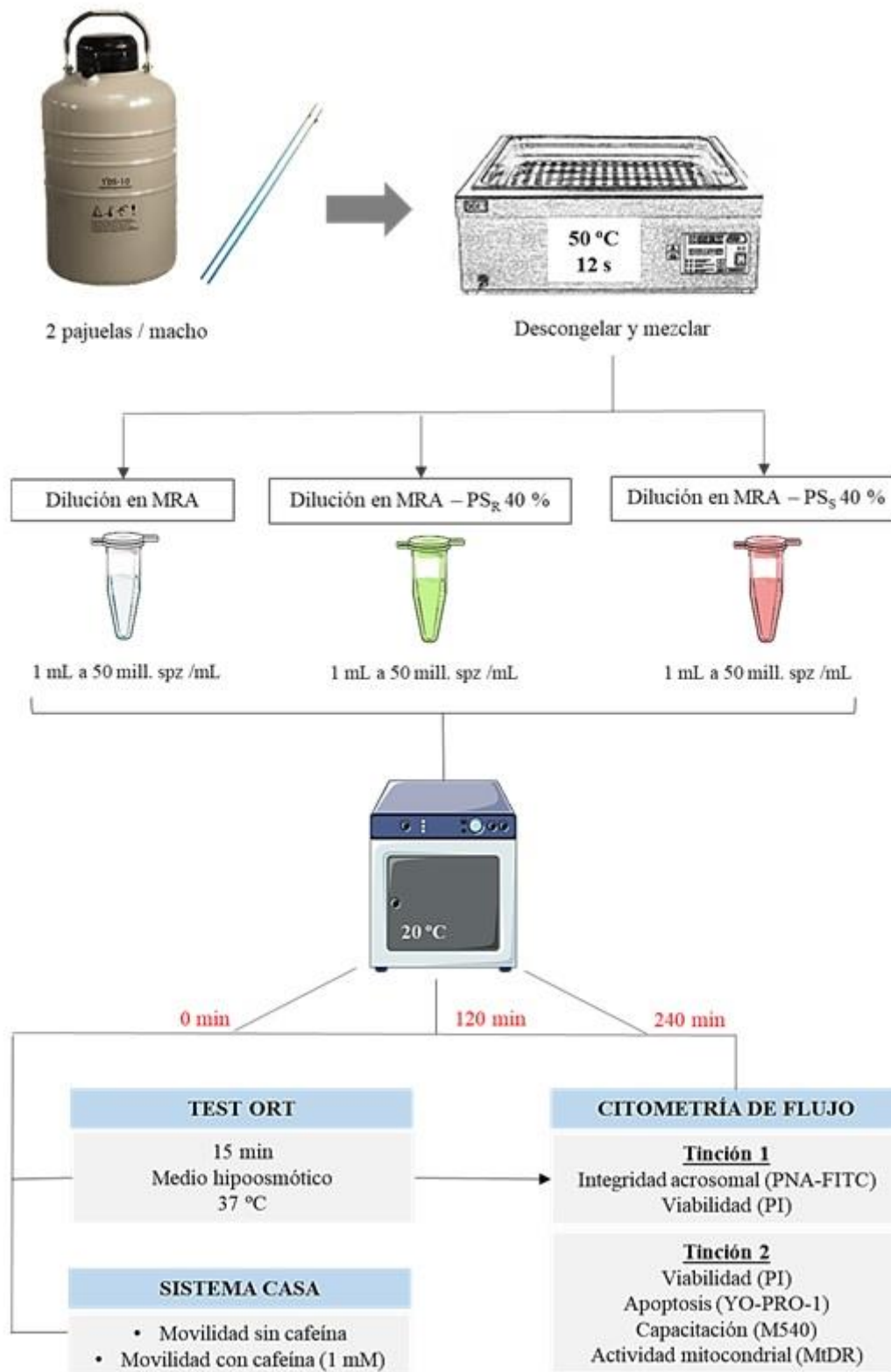


Figura 3. Representación esquemática de las pruebas realizadas para el estudio del efecto del PS en semen descongelado.

3.8. Análisis de datos

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el entorno estadístico R (v. 3.5.0). Se obtuvieron los estadísticos descriptivos para cada parámetro y grupo experimental. Los tratamientos se compararon por medio de modelos lineales de efectos mixtos, para evaluar la existencia de diferencias significativas entre ellos. Todos los datos se muestran como media \pm error estándar.

Para el experimento 1 utilizó una clasificación de los datos no jerarquizada, mediante el método k-means. Se obtuvieron 4 grupos que, según sus medianas, se caracterizaron como excelente, bueno, regular y malo, respecto a la resistencia al choque frío. Los grupos excelente y malo se estudiaron para escoger a los machos más y menos resistentes.

4. Resultados

4.1. Test de resistencia al choque frío

Se realizó un análisis de clusters para clasificar los machos en función de su susceptibilidad al choque frío (**figura 4**). De cada uno de los grupos considerados más extremos se seleccionaron 4 verracos para la obtención de PS, en función de la consistencia entre réplicas y de la disponibilidad de eyaculados.

4.2. Ensayo del efecto del PS en semen descongelado

4.2.1. Movilidad

Para investigar los efectos de la suplementación con plasma seminal, se evaluaron en las dosis descongeladas de cada macho distintos parámetros de movilidad espermática. En el caso de las muestras tratadas con PS_R, se observó un incremento significativo ($p < 0,001$) tanto de los valores de movilidad total (MT) como de movilidad progresiva (MP) respecto del control en todos los periodos de incubación (**figura 5**). La adición de PS_S, en cambio, no supuso alteraciones significativas en estos parámetros.

Los resultados relativos a los parámetros de VCL, VSL, VAP, ALH y BCF se detallan en la **tabla 1**. La VSL de los espermatozoides no se vio significativamente afectada por la adición de PS. No obstante, tanto la incubación con PS_R como con PS_S supuso una disminución del resto de parámetros nombrados respecto del control, aunque no se apreciaron diferencias significativas entre la aplicación de ambos tratamientos. El

No se observaron efectos de la adición de PS en la linealidad (LIN) ni el tambaleo (WOB) del movimiento de los espermatozoides (**tabla 1**). Sin embargo, sí se encontraron diferencias ($p < 0,05$) en el grupo PS_S respecto del control en cuanto a la rectitud (STR) de la trayectoria.

El análisis de la motilidad con estimulación por cafeína no mostró diferencias significativas entre tratamientos para ninguno de los parámetros valorados, a excepción de VAP. La incubación de las muestras con PS, independientemente de su origen, supuso la obtención de valores de VAP significativamente menores ($p < 0,05$) que en el análisis de las muestras control (**figura 6**).

3.1.1. Estudio de parámetros fisiológicos

Los resultados mostraron cambios en la fisiología de los espermatozoides descongelados incubados con PS tras la descongelación, al compararlos con las muestras incubadas en condiciones similares sin PS.

La **tabla 2** muestra los resultados obtenidos para las variables evaluadas. La viabilidad (porcentaje de espermatozoides con tinción negativa tanto para PI como para YO-PRO-1) experimentó un incremento transitorio tras dos horas de incubación, en los tres tratamientos (**figura 7**). Tanto a las dos horas de incubación como transcurridas cuatro, las muestras incubadas con PS presentaron una viabilidad significativamente mayor que las muestras control ($p < 0,05$). No se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos PS_R y PS_S para este parámetro.

La proporción de espermatozoides con marcaje positivo para YO-PRO-1 y negativo para PI, característica propia de células apoptóticas, mostró una tendencia decreciente con el tiempo de incubación. Dicha proporción fue considerablemente más alta en las muestras incubadas con PS (**tabla 2**), sin encontrarse diferencias significativas entre la adición de PS_R y de PS_S. Atendiendo a la ratio de espermatozoides apoptóticos de entre los vivos (PI⁻), la tendencia es similar; con una disminución de la proporción de espermatozoides con marcaje YO-PRO-1⁺ a las dos horas de incubación, y valores mayores en el caso de la incubación con PS respecto del control (**figura 8**). En este caso tampoco se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos con PS.

Tabla 1. Valoración cinética mediante sistema CASA de semen descongelado de verraco (n=6) tras 0, 120 y 240 min de incubación en medio MR-A (control), MR-A suplementado en un 20 % con PS de verracos resistentes al choque frío (PS_R) y MR-A suplementado en un 20 % con PS de verracos susceptibles al choque frío (PS_S). Los datos se muestran como media ± SEM. Las diferencias significativas con el control se muestran como: *p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,001.

EVALUACIÓN PARÁMETROS CINÉTICOS									
	<i>Control</i>			<i>PS_R</i>			<i>PS_S</i>		
	0 min	120 min	240 min	0 min	120 min	240 min	0 min	120 min	240 min
VCL (µm/s)	83,4±7,0	71,8±4,3	72,2±11,4	56,7±5,7**	58,2±6,5**	56,7±5,4**	56,9±6,4***	56,4±4,9***	48,2±3,0***
VSL (µm/s)	33,8±3,4	29,3±2,6	22,9±3,0	27,3±4,0	27,9±4,0	22,7±2,4	29,4±2,5	24,1±1,6	24,8±1,6
VAP (µm/s)	52,3±5,7	47,0±3,9	48,4±6,6	38,3±4,8*	38,4±5,4*	37,4±2,6*	40,2±3,9**	35,1±2,1**	31,3±1,3**
ALH (µm/s)	1,7±0,1	1,4±0,1	1,5±0,2	1,3±0,1*	1,4±0,1*	1,4±0,1*	1,3±0,1**	1,3±0,1**	1,3±0,1**
BCF (µm/s)	17,2±1,6	15,0±1,3	15,1±1,9	12,8±1,8*	13,0±2,0*	10,5±1,3*	13,7±1,7**	10,9±0,7**	9,3±1,2**
LIN (%)	48,2±3,4	45,1±3,7	43,6±9,0	52,6±3,7	49,8±3,6	47,8±2,7	53,1±2,9	48,6±2,8	57,4±4,9
STR (%)	74,5±1,9	71,3±3,2	63,2±7,8	76,9±2,6	75,0±2,4	75,2±2,2	80,0±2,1*	75,0±2,0*	78,8±3,7*
WOB (%)	64,9±3,5	71,4±2,4	69,0±6,6	68,8±2,5	71,5±2,8	68,6±1,9	68,8±1,7	69,1±2,9	73,0±3,7

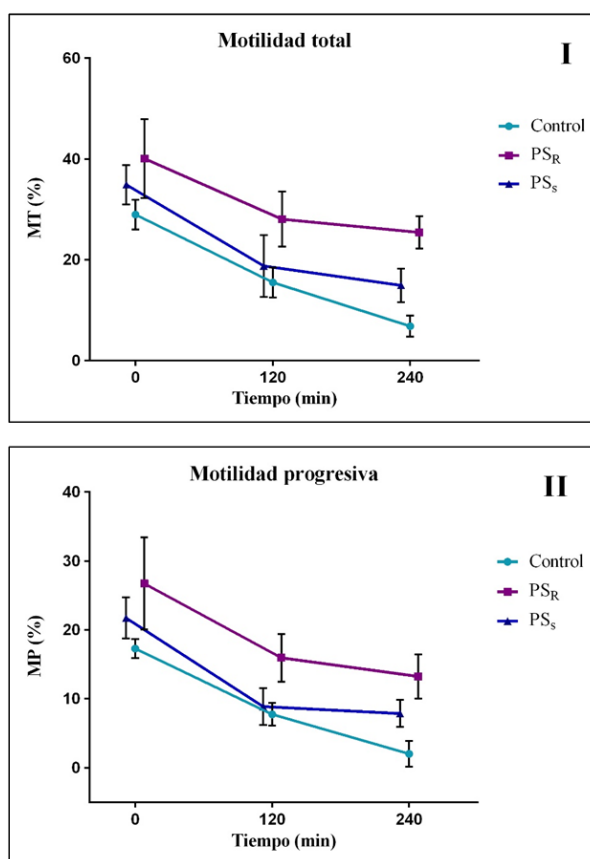


Figura 5. Porcentaje de espermatozoides móviles (MT; imagen I) y móviles progresivos (MP; imagen II) de semen descongelado de verraco (n=6). Las muestras fueron incubadas a distintos tiempos en medio MR-A (control), MR-A suplementado en un 20 % con PS de verracos resistentes al choque frío (PS_R) y MR-A suplementado en un 20 % con PS de verracos susceptibles al choque frío (PS_S). Se representa la media ± SEM.

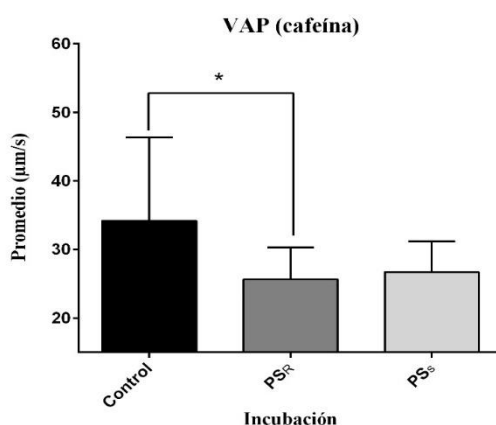


Figura 6. Valores de VAP obtenidos, mediante valoración cinética (CASA), de semen de verraco sometido a una estimulación con cafeína. Se analizó el semen descongelado procedente de 6 machos tras su incubación en medio MR-A (control), MR-A suplementado en un 20 % con PS de verracos resistentes al choque frío (PS_R) y MR-A suplementado en un 20 % con PS de verracos susceptibles al choque frío (PS_S). Se representa la media ± SEM. La presencia de * indica diferencias significativas (p<0,05) entre tratamientos.

El porcentaje de espermatozoides viables con una fluidez de membrana incrementada (mayor tinción de M540), característica asociada al estatus de capacitación espermática, fue considerablemente más alta en las muestras incubadas con PS, independientemente de la procedencia del mismo (**tabla 2**). Este incremento fue casi inmediato, siendo evidente tras la adición de PS ($p < 0,001$ para PS_R y para PS_S con respecto al control), para mantenerse estable a lo largo del tratamiento, con una ligera tendencia a la baja a partir de las dos horas de incubación. Al presentar los datos en relación a la población de espermatozoides viables (YO-PRO-1-), la dinámica fue similar. En este caso la proporción de espermatozoides capacitados en las muestras tratadas con PS mostró una tendencia decreciente más clara, aunque no significativa, con el paso del tiempo (**figura 9**).

No se observaron cambios en la proporción de acrosomas dañados con el tiempo de incubación, pero sí se observa que las muestras incubadas con PS muestran una proporción de espermatozoides con acrosomas dañados mayor que el control, sin diferencias entre el tipo de tratamiento (**tabla 2**). Este incremento no se debe a una mayor mortalidad espermática inducida por el tratamiento; en las muestras tratadas se observa una mayor proporción de espermatozoides viables con acrosomas reaccionados, significativa ($p < 0,001$) en el caso del tratamiento con PS_S (**figura 10**).

La proporción de espermatozoides con mitocondrias activas disminuyó con el tiempo de tratamiento, siendo a las cuatro horas significativamente menor ($p < 0,01$) que al principio del experimento (**tabla 2**). No obstante, dicha proporción no difirió significativamente entre tratamientos.

3.1.2. Test de resistencia osmótica (ORT)

Los valores obtenidos con la realización del test de resistencia osmótica (ORT) se muestran en la **tabla 3**. Se determinó el ratio de espermatozoides viables (PI-) tras el choque hipoosmótico, con respecto los valores de viabilidad obtenidos antes del choque, así como el ratio de acrosomas intactos (PNA-FITC-). No se observaron tendencias evidentes ni diferencias entre tratamientos en la respuesta de las muestras seminales al choque osmótico, ni en cuanto a la viabilidad espermática ni en cuanto al daño acrosomal.

Viabilidad

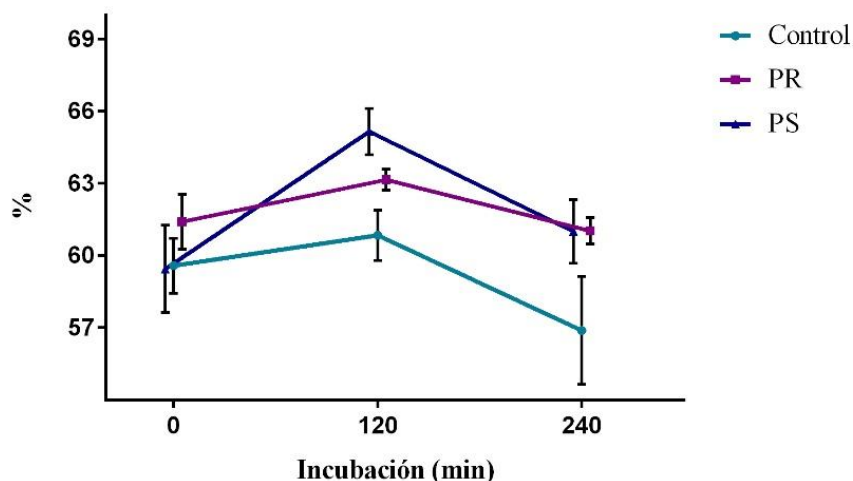


Figura 7. Porcentaje de espermatozoides viables (PI-/YO-PRO-1-) en semen descongelado de verraco (n=6) tras 0, 120 y 240 min de incubación en medio MR-A (control), MR-A suplementado en un 20 % con PS de verracos resistentes al choque frío (PS_R) y MR-A suplementado en un 20 % con PS de verracos susceptibles al choque frío (PS_S). Se representa la media \pm SEM.

Apoptosis

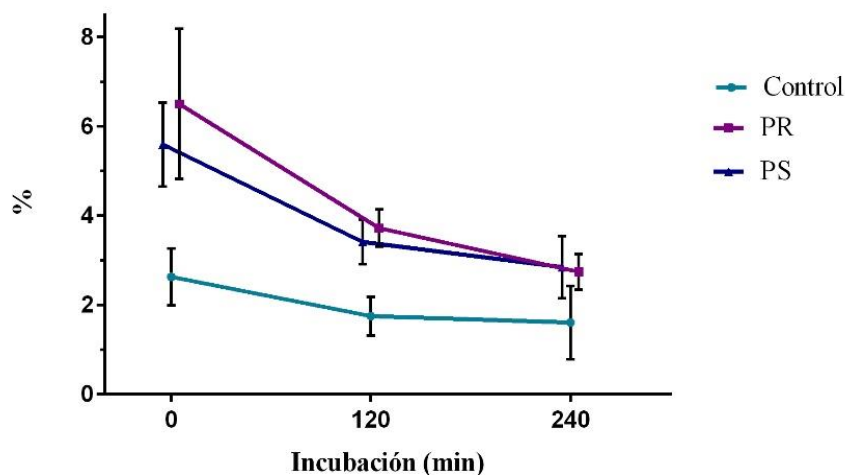


Figura 8. Ratio de espermatozoides apoptóticos respecto de los viables, expresado en porcentaje. Se analizó mediante citometría de flujo semen descongelado de verraco (n=6) tras distintos tiempos de incubación (0, 120 y 240 min) en medio MR-A (control), MR-A suplementado en un 20 % con PS de verracos resistentes al choque frío (PS_R) y MR-A suplementado en un 20 % con PS de verracos susceptibles al choque frío (PS_S). Se representa la media \pm SEM.

Capacitación

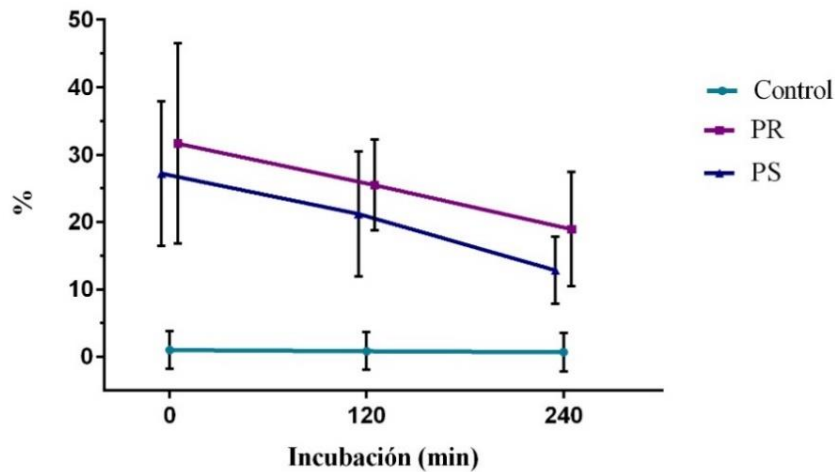


Figura 9. Ratio de espermatozoides capacitados respecto de los viables, expresado en porcentaje. Se analizó mediante citometría de flujo semen descongelado de verraco (n=6) tras distintos tiempos de incubación (0, 120 y 240 min) en medio MR-A (control), MR-A suplementado en un 20 % con PS de verracos resistentes al choque frío (PS_R) y MR-A suplementado en un 20 % con PS de verracos susceptibles al choque frío (PS_S). Se representa la media \pm SEM.

Acrosomas dañados

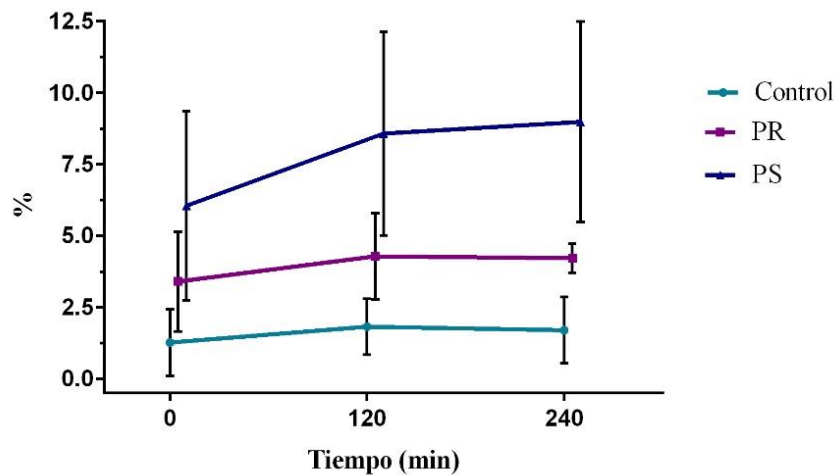


Figura 10. Ratio de espermatozoides con daño acrosomal respecto de los viables, expresado en porcentaje. Se analizó semen descongelado de verraco (n=6) tras 0, 120 y 240 min de incubación en medio MR-A (control), MR-A suplementado en un 20 % con PS de verracos resistentes al choque frío (PS_R) y MR-A suplementado en un 20 % con PS de verracos susceptibles al choque frío (PS_S). Se representa la media \pm SEM.

Tabla 2. Valoración mediante citometría de flujo de semen descongelado de verraco (n=6) tras 0, 120 y 240 min de incubación en medio MR-A (control), MR-A suplementado en un 20 % con PS de verracos resistentes al choque frío (PS_R) y MR-A suplementado en un 20 % con PS de verracos susceptibles al choque frío (PS_S), sobre los parámetros de viabilidad espermática, apoptosis celular, actividad mitocondrial, daño acrosomal y capacitación. Los datos se muestran como media ± SEM. Las letras minúsculas (a-c) indican diferencias significativas (p<0,05) en los datos de una columna para un parámetro dado (% células viables, % células apoptóticas, % espermatozoides con actividad mitocondrial, % espermatozoides con acrosomas dañados y % espermatozoides capacitados).

		Viabilidad	Células apoptóticas	Actividad mitocondrial	Acrosomas dañados	Capacitación
<i>Control</i>	0 min	59,58±2,80 ^{ad}	1,44±0,95 ^{ac}	55,33±3,90 ^{ac}	13,23±5,30 ^a	0,54±5,14 ^a
	120 min	60,84±2,57 ^{ac}	0,98±0,40 ^{ad}	55,34±3,78 ^{bc}	13,05±5,55 ^a	0,37±5,33 ^a
	240 min	56,89±5,48 ^{ad}	0,91±0,80 ^{ad}	48,99±8,94 ^a	11,97±7,33 ^a	0,29±5,32 ^a
<i>PS_R</i>	0 min	61,40±2,81 ^{bd}	3,41±1,81 ^{bc}	53,73±7,99 ^{ac}	18,20±7,27 ^b	16,98±22,63 ^b
	120 min	63,15±1,06 ^{bc}	2,05±0,56 ^{bd}	56,44±1,24 ^{bc}	18,78±3,19 ^b	16,58±11,80 ^b
	240 min	61,03±1,34 ^{bd}	1,56±0,47 ^{bd}	51,25±2,42 ^a	20,59±3,18 ^b	12,33±14,58 ^b
<i>PS_S</i>	0 min	59,44±4,43 ^{bd}	2,94±0,98 ^{bc}	52,06±9,13 ^{ac}	24,22±14,42 ^b	13,77±14,96 ^b
	120 min	65,15±2,36 ^{bc}	2,06±0,75 ^{bd}	56,97±3,90 ^{bc}	23,39±8,13 ^b	14,40±15,12 ^b
	240 min	61,00±3,23 ^{bd}	1,67±0,81 ^{bd}	49,58±5,88 ^a	26,47±12,57 ^b	8,13±7,21 ^b

Tabla 3. Valores medios obtenidos tras realizar una prueba de resistencia osmótica (ORT) en semen descongelado de verraco (n=6), para distintos tiempos de incubación en medio MR-A (control), MR-A suplementado en un 20 % con PS de verracos resistentes al choque frío (PS_R) y MR-A suplementado en un 20 % con PS de verracos susceptibles al choque frío (PS_S). Se determinó el ratio de viabilidad (ratio entre el porcentaje de espermatozoides viables tras el choque osmótico y la proporción de viables antes del choque), así como el ratio de espermatozoides con acrosomas intactos (cociente entre la proporción de espermatozoides con acrosomas intactos después y antes del choque osmótico). Los datos se muestran como media ± SEM.

Test de resistencia osmótica (ORT)			
		Viabilidad	Integridad acrosomal
<i>Control</i>	0 min	60,7±25,7	95,6±5,4
	120 min	57,0±14,1	93,5±7,4
	240 min	50,7±9,7	98,9±11,4
<i>PS_R</i>	0 min	55,4±21,6	93,4±10,0
	120 min	57,2±17,4	92,6±5,6
	240 min	53,0±11,1	94,9±3,5
<i>PS_S</i>	0 min	54,0±19,4	94,2±9,0
	120 min	53,3±15,5	92,7±6,5
	240 min	49,5±8,6	95,1±6,1

5. Discusión

A pesar de que el PS se elimina del eyaculado de forma rutinaria en las técnicas de reproducción asistida, numerosos estudios apuntan a que su aplicación mejora la calidad seminal tras los procesos de congelación y descongelación (Caballero *et al.*, 2008; Okazaki *et al.*, 2009; González Urdiales, 2011; Fernández-Gago *et al.*, 2017).

En el presente estudio, realizamos en primer lugar una clasificación de los verracos en función de la resistencia de su semen al choque frío, y obtuvimos PS de los eyaculados de aquellos seleccionados entre los resistentes y los susceptibles a dicha prueba. Se formaron dos lotes de plasma seminal (PS_R y PS_S) y se utilizaron para suplementar dosis seminales descongeladas. Confirmamos que la adición de PS produce un incremento en la viabilidad espermática post-descongelación, pero también mayor tasa de apoptosis y de daño acrosomal en los espermatozoides, además de un aumento de la capacitación. No se encontraron efectos en la actividad mitocondrial de los espermatozoides, ni en su resistencia al choque osmótico.

Se ha comprobado que existe una elevada variabilidad en la resistencia de los espermatozoides de verraco al choque frío y a los procesos de crioconservación, de manera que la calidad espermática tras estos procesos depende en gran medida del macho del que procede el semen (Holt, 2000; Thurston *et al.*, 2002; Waterhouse *et al.*, 2006; Fraser, Strzeżek y Kordan, 2014; Yeste, 2017). Los resultados de este estudio muestran respuestas muy diferentes de los espermatozoides al proceso de choque frío en función del verraco del que procedan. Esta variabilidad, que según se ha demostrado tiene una base genética, se puede explicar parcialmente por las diferencias en la composición de las membranas celulares de los espermatozoides (Thurston *et al.*, 2002; Yeste, 2017). La resistencia de los espermatozoides a la congelación depende en parte de la composición en lípidos de su membrana, concretamente de la proporción de colesterol y la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga que posea (Waterhouse *et al.*, 2006; González Urdiales, 2011). La presencia de ciertas proteínas en la membrana plasmática del espermatozoide también va a influir en su supervivencia a la criopreservación y, de hecho, estas moléculas pueden servir como marcadores de congelabilidad (Waterhouse *et al.*, 2006; Vilagran *et al.*, 2015; Guimarães *et al.*, 2017; Yeste, 2017). No obstante, existen evidencias de que las diferencias entre verracos pueden deberse también a factores

externos al espermatozoide, fundamentalmente el plasma seminal. Así, existen estudios que concluyen que la distinta congelabilidad del semen podría estar más relacionada con la composición del PS o con las funciones de las glándulas sexuales accesorias, que con las características de los espermatozoides (Thurston *et al.*, 2002; González Urdiales, 2011; Guimarães *et al.*, 2017; Yeste, 2017). Los espermatozoides son células con una limitada capacidad biosintética, por lo que su funcionalidad está controlada en gran parte por la interacción con componentes del medio circundante, y el PS es el medio natural en que se encuentran en el eyaculado (Colás *et al.*, 2009). Esta compleja mezcla de secreciones del testículo, el epidídimo y las glándulas sexuales accesorias es rica en oligosacáridos, glicanos, lípidos, iones inorgánicos, péptidos y proteínas (Vilagran *et al.*, 2015). Estos componentes del PS, sobre todo proteínas que se adsorben a la membrana plasmática del espermatozoide, median la comentada interacción, regulando la función espermática y facilitando el tránsito por el tracto reproductor femenino (Colás *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011; Samanta *et al.*, 2018).

La composición del PS varía en función de la especie (en el caso del verraco, por ejemplo, abundan las espermadhesinas), pero también difiere entre individuos de la misma especie (Caballero *et al.*, 2008; Yeste, 2017). Por ello, el contenido del PS en determinados componentes es uno de los factores que determina su efecto, de forma que la respuesta espermática a la presencia de PS va a depender de la procedencia de este, hasta el punto en que el efecto puede ser negativo o positivo en función del verraco del que se obtiene (Caballero *et al.*, 2008; González Urdiales, 2011; Vilagran *et al.*, 2015).

Para que tenga lugar el proceso de fecundación en IA es fundamental que los espermatozoides presenten una motilidad adecuada. Sin embargo, uno de los principales daños que se manifiestan en el espermatozoide como consecuencia de la criopreservación es una reducción de esta capacidad, principalmente por la aparición de cambios estructurales en su membrana plasmática (González Urdiales, 2011). Los resultados de este estudio muestran que la suplementación con PS_R tras la descongelación ayuda a retrasar esta pérdida de movilidad, en concordancia con observaciones previas (Okazaki *et al.*, 2009; González Urdiales, 2011; Fernández-Gago *et al.*, 2017). Que este efecto solo quedase patente cuando se utilizó PS de verracos resistentes al choque frío podría explicarse por la presencia o ausencia de ciertos componentes en este PS, que no se dé en el caso del plasma de machos susceptibles. De hecho, ya se han identificado potenciales

marcadores de congelabilidad seminal en estudios comparativos del proteoma del PS de verracos considerados como “buenos” y “malos” congeladores, como la fibronectina (Vilagran *et al.*, 2015) o la actividad de la enzima N-acetil- β -hexosaminidasa (Wysocki *et al.*, 2015).

Los espermatozoides a lo largo del proceso de criopreservación sufren una serie de daños que incluyen la desestabilización de sus membranas y la activación de mecanismos de apoptosis, que suponen una reducción de la supervivencia tras la descongelación (Fraser, Strzeżek y Kordan, 2014). En consonancia con otros estudios (Fernández-Gago, Domínguez y Martínez-Pastor, 2013; Fernández-Gago *et al.*, 2017), la adición de PS en nuestro caso supuso un incremento en la integridad de membrana de los espermatozoides (asociada a viabilidad) tras el proceso de descongelación, sin que su procedencia influyera en el efecto producido. No obstante, aunque la viabilidad se vio aumentada, la apoptosis también fue mayor en el caso de las muestras incubadas con PS.

Otros componentes del PS que actúan en la protección de los espermatozoides frente al descenso térmico son los llamados factores decapacitantes; moléculas que previenen la capacitación celular, y que incluyen proteínas de la familia de las espermadhesinas (González Urdiales, 2011). Diversos autores mencionan la capacidad del PS de revertir el estatus de capacitación inducido por el proceso de criopreservación en los espermatozoides de verraco, y de disminuir la incidencia de la reacción acrosómica (Vadnais *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2007; González Urdiales, 2011). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio no se corresponden con estos hallazgos, aunque sí con estudios como el de Fernández-Gago, Domínguez y Martínez-Pastor (2013), que observaron un incremento en la fluidez de membrana de los espermatozoides al incubar muestras seminales descongeladas con un 50 % de PS, así como una mayor proporción de espermatozoides con acrosomas reaccionados.

Aunque se ha descrito que ciertos componentes del plasma seminal de verraco (por ejemplo, las espermadhesinas PSP-I y PSP-II) están implicados en el mantenimiento de la actividad mitocondrial de los espermatozoides (González-Cadavid *et al.*, 2014), en este estudio la incubación de las muestras seminales descongeladas con PS no tuvo efecto en este parámetro. La adición de PS no afectó tampoco a la resistencia de los espermatozoides al choque osmótico. Si bien existe algún estudio que reporta, en verraco,

una disminución de la resistencia hipoosmótica de los espermatozoides del eyaculado (y por tanto en contacto con PS) con respecto a la de espermatozoides obtenidos del epidídimo (Tsikis *et al.*, 2018), es posible que la respuesta a este estrés dependa principalmente de factores celulares, como la presencia de ciertos canales de membrana y otras proteínas de la membrana espermática (Yeste, 2017).

6. Conclusiones

Teniendo en cuenta todos los resultados, podemos concluir que la suplementación del semen de verraco tras la descongelación con un 20 % de plasma seminal produce cambios en la fisiología de los espermatozoides, presumiblemente por medio de la interacción de proteínas presentes en el mismo con la membrana del espermatozoide. La adición de PS, aunque provoca la aparición ciertos efectos poco deseables (mayor tasa de apoptosis, aumento de la capacitación e incremento de acrosomas dañados) ayuda a mantener la viabilidad espermática post-descongelación, por lo que su aplicación podría resultar ventajosa a la hora de descongelar las dosis seminales.

El choque frío ha resultado ser un método de utilidad a la hora de seleccionar los verracos de los que obtener el PS, en tanto en cuanto el PS procedente de machos resistentes a este estrés produjo mejoras en la movilidad espermática, que solo se apreciaron con este tratamiento.

Por último, sería interesante analizar el perfil proteómico de los dos tipos de plasma seminal estudiado, con el fin de identificar los componentes responsables de los efectos observados.

7. Agradecimientos

Este estudio ha sido subvencionado por el Campus de Excelencia Internacional de la Universidad de Oviedo, a través de la financiación concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deportes dentro de la convocatoria de ayudas para la consolidación de proyectos de excelencia de las universidades (2015), Proyecto CEI15-24 “Pasantías en empresas”.

Quisiera expresar mi agradecimiento mis tutores, Felipe Martínez Pastor y Raúl González Urdiales por su ayuda, colaboración y paciencia en la realización de este trabajo.

A AIM Ibérica por proporcionar las muestras para el estudio.

A todo el equipo de INDEGSAL, especialmente a Itxaso Crespo y Estela Fernández, por el tiempo invertido en enseñarme las técnicas experimentales y ayudarme con el análisis de los datos. Sin su ayuda, este trabajo no habría sido posible.

A mi familia, amigos y todas las personas que han hecho posible este proyecto.

8. Referencias bibliográficas

Barrios, B., Pérez-Pé, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muiño-Blanco, T. y Cebrián-Pérez, J. A. (2000) «Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane», *Biology of Reproduction*, 63(5), pp. 1531-1537. doi: 10.1095/biolreprod63.5.1531.

Caballero, I., Vazquez, J. M., García, E. M., Parrilla, I., Roca, J., Calvete, J. J., Sanz, L. y Martínez, E. A. (2008) «Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa», *Theriogenology*, 70(8), pp. 1352-1355. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.07.013.

Colás, C., Junquera, C., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J. A. y Muiño-Blanco, T. (2009) «Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold-shock», *Microscopy Research and Technique*, 72(8), pp. 566-572. doi: 10.1002/jemt.20710.

Fernández-Gago, R., Álvarez-Rodríguez, M., Alonso, M. E., Ramiro González, J., Alegre, B., Domínguez, J. C. y Martínez-Pastor, F. (2017) «Thawing boar semen in the presence of seminal plasma improves motility, modifies subpopulation patterns and reduces chromatin alterations», *Reproduction, Fertility and Development*, 29(8), pp. 1576-1584. doi: 10.1071/RD15530.

Fernández-Gago, R., Domínguez, J. C. y Martínez-Pastor, F. (2013) «Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: a flow cytometry study», *Theriogenology*, 80(4), pp. 400-410. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.05.003.

Fraser, L., Strzeżek, J. y Kordan, W. (2014) «Post-thaw sperm characteristics following long-term storage of boar semen in liquid nitrogen», *Animal Reproduction Science*, 147, pp. 119-127. doi: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2014.04.010.

González-Cadavid, V., Martins, J. A. M., Moreno, F. B., Andrade, T. S., Santos, A. C. L., Monteiro-Moreira, A. C. O., Moreira, R. A. y Moura, A. A. (2014) «Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters», *Theriogenology*, 82(5), pp. 697-707. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.05.024.

González Urdiales, R. (2011) *Valoración de la capacidad de criopreservación espermática del semen porcino mediante técnicas de choque a frigore y termorresistencia*. Universidad de León. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10612/843>.

Guimarães, D. B., Barros, T. B., van Tilburg, M. F., Martins, J. A. M., Moura, A. A., Moreno, F. B., Monteiro-Moreira, A. C., Moreira, R. A. y Toniolli, R. (2017) «Sperm membrane proteins associated with the boar semen cryopreservation», *Animal Reproduction Science*, 183, pp. 27-38. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.06.005.

Hancock, J. y Howell, G. (1959) «The collection of boar semen.», *Veterinary Record*, 71, pp. 664-665.

Hernández, M., Roca, J., Calvete, J. J., Sanz, L., Muino-Blanco, T., Cebrian-Perez, J. A., Vazquez, J. M. y Martinez, E. A. (2007) «Cryosurvival and *in vitro* fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars», *Journal of Andrology*, 28(5), pp. 689-697. doi: 10.2164/jandrol.107.002725.

Holt, W. V (2000) «Basic aspects of frozen storage of semen», *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), pp. 3-22. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00152-4.

Okazaki, T., Abe, S., Yoshida, S. y Shimada, M. (2009) «Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality», *Theriogenology*, 71(3), pp. 491-498. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.08.014.

Pursel, V. G., Johnson, L. A. y Schulman, L. L. (1973) «Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa», *Journal of Animal Science*, 37(2), pp. 528-531.

Rodríguez-Martínez, H., Kvist, U., Ernerudh, J., Sanz, L. y Calvete, J. J. (2011) «Seminal plasma proteins: what role do they play?», *American Journal of Reproductive Immunology*, 66(Suppl. 1), pp. 11-22. doi: 10.1111/j.1600-0897.2011.01033.x.

Samanta, L., Parida, R., Dias, T. R. y Agarwal, A. (2018) «The enigmatic seminal plasma: a proteomics insight from ejaculation to fertilization», *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), p. 41. doi: 10.1186/s12958-018-0358-6.

Schilling, E., Vengust, M. y Smidt, D. (1984) «ORT - A new test to predict the freezability and storage of boar spermatozoa», en *8th Congress of the International Pigs Veterinary Society*. Ghent, p. 296.

Thurston, L. M., Siggins, K., Mileham, A. J., Watson, P. F. y Holt, W. V (2002) «Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation», *Biology of Reproduction*, 66(3), pp. 545-554. doi: 10.1095/biolreprod66.3.545.

Torres, M. A., Ravagnani, G. M., Leal, D. F., Martins, S. M. M. K., Muro, B. B. D., Meirelles, F. V., Papa, F. O., Dell'aqua Junior, J. A., Alvarenga, M. A., Moretti, A. S. y De Andrade, A. F. C. (2016) «Seminal plasma arising from the whole boar sperm-rich fraction increases the stability of sperm membrane after thawing», *Journal of Animal Science*, 94(5), pp. 1906-1912. doi: 10.2527/jas2016-0293.

Tsikis, G., Reynaud, K., Ferchaud, S. y Druart, X. (2018) «Seminal plasma differentially

alters the resistance of dog, ram and boar spermatozoa to hypotonic stress», *Animal Reproduction Science*, 193, pp. 1-8. doi: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2018.01.012.

Vadnais, M. L., Kirkwood, R. N., Specher, D. J. y Chou, K. (2005) «Effects of extender, incubation temperature, and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining», *Animal Reproduction Science*, 90, pp. 347-354. doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.02.007.

Vilagran, I., Yeste, M., Sancho, S., Castillo, J., Oliva, R. y Bonet, S. (2015) «Comparative analysis of boar seminal plasma proteome from different freezability ejaculates and identification of Fibronectin 1 as sperm freezability marker», *Andrology*, 3(2), pp. 345-356. doi: 10.1111/andr.12009.

Waterhouse, K. E., Hofmo, P. O., Tverdal, A. y Miller, R. R. (2006) «Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm», *Reproduction*, 131(5), pp. 887-894. doi: 10.1530/rep.1.01049.

Wysocki, P., Orzołek, A., Strzeżek, J., Kozirowska-Gilun, M., Zasiadczyk, Ł. y Kordan, W. (2015) «The activity of N-acetyl- β -hexosaminidase in boar seminal plasma is linked with semen quality and its suitability for cryopreservation», *Theriogenology*, 83(7), pp. 1194-1202. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.12.025.

Yeste, M. (2016) «Sperm cryopreservation update: cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs», *Theriogenology*, 85(1), pp. 47-64. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.09.047.

Yeste, M. (2017) «State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state», *Animal Reproduction*, 14(1), pp. 69-81. doi: 10.21451/1984-3143-AR895.

Yeste, M., Briz, M., Pinart, E., Sancho, S., Bussalleu, E. y Bonet, S. (2010) «The osmotic tolerance of boar spermatozoa and its usefulness as sperm quality parameter», *Animal Reproduction Science*, 119(3-4), pp. 265-274. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.02.011.