

MÉTODOS DE SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES PORCINOS CRIOPRESERVADOSMM Satorre¹, E Breininger*¹, MT Beconi¹¹ Cátedra de Química Biológica, INITRA, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.
Av. Chorroarín 280, C1427CWO Buenos Aires, ARGENTINA. ebreininger@fvvet.uba.ar**INTRODUCCIÓN**

La inseminación artificial porcina es una técnica reproductiva de amplia aplicación en países desarrollados, pero prácticamente la totalidad se realiza con semen refrigerado, quedando el uso de semen congelado limitado a casos muy específicos (*Johnson y col, 2000*). La baja performance reproductiva lograda con semen congelado se debe a una combinación de efectos negativos sobre la función e integridad estructural espermática durante el proceso de congelamiento-descongelamiento (*Watson, 1995*). Los espermatozoides muertos o anormales ejercen un efecto tóxico (*Shannon y Curson, 1972*) sobre el resto de las células, reduciendo la fertilidad. Existen una gran variedad de técnicas de manipulación espermática para remover espermatozoides indeseables, plasma seminal, agentes crioprotectores y otros factores, a fin de aumentar las características cualitativas de los espermatozoides. El fraccionamiento en gradiente discontinuo de Percoll (*Cesari y col, 2006*) y la filtración en columnas de Sephadex (*Busalleu y col, 2008*) permitirían separar espermatozoides porcinos con alta motilidad y funcionalidad.

El objetivo del trabajo ha sido estudiar la eficiencia de los métodos de selección propuestos para mejorar la calidad de muestras de espermatozoides porcinos criopreservados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de semen fueron congeladas en pastillas de 0,2mL, de acuerdo al protocolo de Pursel y Johnson (*1975*). Se descongelaron en BTS a 38°C por 10 min y se dividieron en tres alícuotas para ser tratadas por alguno de los siguientes métodos: A) Lavado, B) Centrifugación en gradiente discontinuo (25/50) de Percoll y C) Filtración en columna de Sephadex (20%). Se evaluaron los parámetros de calidad de las muestras:

Movilidad: microscopía óptica con platina termostaticada a 37 °C; Viabilidad: eosina-nigrosina; Integridad acrosomal en espermatozoides (sp) vivos: técnica combinada de azul tripán 0.25% y DIC; Inducción de la capacitación con bicarbonato (40 mM), a 38 °C en atmósfera de CO₂ 5 % durante 30 minutos, siendo evaluadas por la inducción de la reacción acrosomal con fluido folicular (30%).

RESULTADOS

Los parámetros de calidad espermática post-descongelamiento se incrementaron por la selección con los diferentes métodos, siendo significativamente superior la motilidad e integridad acrosomal obtenidas en las muestras seleccionadas por Sephadex. Cuando se evaluó

la respuesta de los diferentes tratamientos en la capacitación in vitro no se observaron diferencias significativas respecto a las muestras sin seleccionar, sin embargo, se observó una mayor movilidad (datos no mostrados) en las muestras seleccionadas por Sephadex.

	MOV (%)	VIA (%)	I.A. (%)	R.A. (%)
Lavado	29±3 _A	45±2 ^A	34±4 ^A	17±2 ^A
Percoll	47±4 _B	54±5 ^B	43±3 ^B	19±2 ^A
Sephadex	60±6 _C	59±2 ^B	55±3 ^C	17±1 ^A

Parámetros de calidad espermática: MOV: % de espermatozoides móviles; VIA: % de espermatozoides vivos; I.A.: % de espermatozoides vivos con acrosoma intacto. Respuesta a inductores de capacitación in vitro: R.A.: % de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado.

DISCUSIÓN

Si bien el lavado es relativamente eficiente en la eliminación de los componentes del diluyente de congelamiento, no elimina espermatozoides muertos o inmóviles, y la movilidad obtenida es muy baja.

El Percoll permite separar los espermatozoides del diluyente y material particulado, sin embargo, la proporción de espermatozoides móviles recuperados es baja. Existe alguna evidencia de que la separación por Percoll puede dar lugar a la alteración de la función espermática. Dado que la capacitación y reacción acrosomal prematura han sido propuestas como las manifestaciones primarias de los daños en la criopreservación de espermatozoides, los cambios inducidos por la separación de Percoll pueden exacerbar este daño.

El Sephadex, tienen la ventaja de ser muy rápido, no requiere dilución o sedimentación de los espermatozoides, y selecciona un porcentaje muy alto de los espermatozoides móviles.

Para los espermatozoides criopreservados, encontramos que la filtración por Sephadex fue eficiente para eliminar los espermatozoides muertos o inmóviles, y que la movilidad e integridad acrosomal se mantuvieron después de la selección.

Nuestras observaciones revelan que la selección de semen congelado por Sephadex, conserva la movilidad espermática y la integridad acrosomal mejor que la separación por Percoll, y recupera la mayoría de los espermatozoides móviles, conservando la movilidad alta aún durante la capacitación. Estos atributos merecen un examen serio del método Sephadex para la selección de semen congelado a fin de aumentar el porcentaje de éxito de la inseminación artificial en la especie porcina.