

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PLASMA SEMINAL EQUINO SOBRE LAS  
MEMBRANAS DE LOS ESPERMATOZOIDES Y SU RELACIÓN CON LA  
CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA**

Evaluation of the effect of equine seminal plasma on sperm membranes and its  
relation to sperm capacitation

Alejandro Ferrante, M. Ignacia Carretero, Graciela Chaves, Christian Bisiau, Marina Mamarian,  
Mariana Caldevilla, Marcelo Miragaya, Deborah Neild

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.33>

*Cátedra de Teriogenología,  
Instituto de Investigación y  
Tecnología en Reproducción  
Animal (INITRA), Facultad de  
Ciencias Veterinarias,  
Universidad de Buenos Aires,  
Argentina*

E-mail:  
deborah.neild@gmail.com

**RESUMEN**

Los objetivos del trabajo fueron: 1) evaluar los efectos del plasma seminal y el tiempo de incubación sobre la funcionalidad, integridad y respuesta de las membranas espermáticas equinas y 2) comparar el uso de las tinciones Clortetraciclina (CTC), Filipin, y Coomassie blue (CB). Los eyaculados (n=3; r=4) se mejoraron con Androcoll-E<sup>TM</sup> e incubaron en medio Modified Whittens con y sin 50% de plasma seminal homólogo. A las 0; 1,5 y 3 h se evaluaron: la viabilidad/integridad de membranas (CFDA/PI), la funcionalidad de membranas (HOS), la capacitación (CTC y Filipin), y el estado acrosomal (CB). Si bien la proporción de espermatozoides evidenciando signos de capacitación y reacción acrosomal varió entre metodologías, las tendencias y diferencias registradas en función del tiempo de incubación y del plasma seminal fueron similares. Esta información es importante, porque conocer los efectos del plasma seminal sobre la capacitación espermática podría permitir mejorar los protocolos de criopreservación de espermatozoides equinos.

**Palabras clave:** *capacitación, membranas espermáticas, equino.*

**ABSTRACT**

The objectives of this study were to evaluate the effect of seminal plasma and incubation time on equine sperm membrane integrity, function and reactivity and to compare the use of different evaluation stains: Chlortetracyclin (CTC), Filipin and Coomassie blue (CB). The samples (n=3; r=4) were improved using Androcoll-

E<sup>TM</sup> and incubated in Modified Whittens with and without 50% homologous seminal plasma. The following parameters were evaluated at 0, 1.5 and 3 h: viability/membrane integrity (CFDA/PI), membrane function (HOS), capacitation (CTC and Filipin) and acrosome status (CB). Although the amount of sperm showing capacitation and acrosome reaction varied between techniques, the differences and tendencies

observed with regard to the incubation time and the presence of seminal plasma were similar. This information is important as knowledge on the effects of seminal plasma on sperm capacitation could improve equine semen cryopreservation protocols.

**Keywords:** *capacitation, sperm membranes, equine.*

## INTRODUCCION.

La integridad y el normal funcionamiento de la membrana espermática, así como la capacitación espermática, son prerequisites importantes para una fertilización exitosa. La capacitación produce cambios metabólicos y de membrana en los espermatozoides, que pueden ser utilizados para evaluar el proceso in vitro mediante distintas técnicas de laboratorio. Un método muy utilizado es la tinción con Clortetraciclina (CTC), un antibiótico fluorescente que pone en evidencia el estado acrosomal de los espermatozoides (Varner *et al.*, 1987). Otro método para evaluar la capacitación es monitorear el movimiento del colesterol en la membrana citoplasmática durante la capacitación utilizando el antibiótico fluorescente Filipin, que se une al colesterol (Colenbrander *et al.*, 2002). Una alternativa es evaluar la integridad del acrosoma, que permite determinar si los espermatozoides han completado la capacitación, mediante la tinción con Coomassie blue. Este colorante se une a través de interacciones electrostáticas de sus grupos sulfónicos a las proteínas cargadas positivamente, tiñendo el acrosoma intacto del espermatozoide (Brum *et al.*, 2006).

Se cree que el proceso de capacitación in vivo estaría regulado por componentes del plasma seminal. El plasma seminal ejercería múltiples efectos sobre los espermatozoides y el tracto genital de la hembra, entre los cuales se pueden mencionar la remodelación de la superficie espermática, la regulación de la capacitación tanto por factores negativos (de-capacitantes) como positivos (capacitantes). En equinos sigue siendo controversial el rol del plasma seminal debido a que el conocimiento acerca de sus efectos sobre los espermatozoides y su capacidad de fertilizar parece contradictorio y hasta conflictivo (Kareskoski y Katila, 2008). Resulta entonces de interés estudiar los efectos del plasma seminal sobre la capacitación espermática.

Los objetivos de este estudio fueron: 1) evaluar los efectos del plasma seminal y el tiempo de incubación, en condiciones que promueven la capacitación, sobre la funcionalidad, integridad y respuesta de las membranas y el estado acrosomal de espermatozoides equinos y 2) comparar la evaluación de la capacitación espermática, y el estado de los

acrosomas utilizando las tinciones con CTC, Filipin, y Coomassie blue.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El semen fresco se recolectó utilizando vagina artificial modelo Missouri y un súcubo natural (n=3; r=4). Previo al procesamiento de los eyaculados se evaluó: la movilidad espermática por observación directa sobre platina térmica a 37 °C con microscopio de contraste de fase y la concentración mediante hemocitometría, utilizando una cámara de Neubauer. Las muestras seminales se mejoraron centrifugando a través de Androcoll-E™ y se re-diluyeron a una concentración de 10 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml en medio Modified Whittens con el agregado de bicarbonato de sodio (15 mM) y 6 mg/ml albúmina sérica bovina (McPartlin *et al.*, 2009). A una alícuota se le agregó 50% de plasma seminal homólogo y la otra se mantuvo sin plasma seminal (control). Las muestras se incubaron a 38 °C con 5% de CO<sub>2</sub> en una atmósfera saturada de humedad durante 3 horas. A las 0; 1,5 y 3 h de capacitación se evaluaron: la viabilidad/integridad de membranas (tinción con Diacetato de 6-carboxifluoresceína e Ioduro de Propidio, CFDA/PI), la funcionalidad de membranas (prueba hipoosmótica, HOS), la capacitación (con tinciones de clortetraciclina, CTC y Filipin) y la reacción acrosomal (con tinción de Coomassie blue, CB).

La tinción CFDA/PI y la prueba HOS se realizaron según Neild *et al.* (1999) y la tinción CTC se realizó según Varner *et al.* (1987). La tinción con Filipin se realizó según Colenbrander *et al.* (2002) y la tinción de CB se llevó a cabo según Giuliano *et al.* (2012).

Para la obtención del plasma seminal, los eyaculados fueron centrifugados a 800 g para separar el plasma seminal de los espermatozoides. El sobrenadante fue sometido a una segunda centrifugación a 1000 g por 20 minutos para remover detritus y restos de espermatozoides. El plasma seminal así obtenido se almacenó a -18 °C hasta su posterior utilización.

Análisis estadístico: Para analizar el efecto de los dos factores estudiados sobre los porcentajes de espermatozoides capacitados y reaccionados, se utilizó un ANOVA de factores múltiples. Se empleó un diseño de parcelas divididas en el tiempo, tomando al padrillo como bloque, el porcentaje de plasma seminal como un factor de 2 niveles (0% y 50%) y el tiempo como un factor de 3 niveles (0; 1,5 y 3 h).

## RESULTADOS

Se observó una diferencia en la viabilidad espermática (CFDA/PI) en función del tiempo, disminuyendo significativamente la misma a las 3 h de incubación

( $P < 0,05$ ). También se observó una disminución significativa ( $P = 0,001$ ) de espermatozoides vivos en presencia de 50% de plasma seminal en el medio de capacitación con respecto al control sin plasma seminal. En cuanto a la funcionalidad de membrana (HOS) se observó una disminución significativa de espermatozoides con membranas funcionales a partir de la hora y media de incubación ( $P = 0,0001$ ) pero no se vieron diferencias con el agregado de 50% de plasma seminal al medio. Los resultados de viabilidad y funcionalidad de membranas se pueden observar en la Tabla 1.

seminal en el porcentaje de espermatozoides capacitados evaluados con CTC y Filipin. Al evaluar las muestras teñidas con CTC, se observó una disminución de los espermatozoides capacitados a través del tiempo ( $P = 0,07$ ) y un aumento significativo ( $P = 0,03$ ) en la categoría de espermatozoides reaccionados a las tres horas de incubación respecto de la hora 0. Se observó además que cuando se utilizó 50% de plasma seminal en el medio de incubación, el aumento del porcentaje de espermatozoides reaccionados fue significativamente menor ( $P = 0,01$ ) que en las muestras controles (ver Tabla 2).

No se observó interacción entre los diferentes tiempos evaluados y la ausencia o presencia de plasma

Tabla 1. Viabilidad (evaluada con la tinción CFDA/PI) y funcionalidad de membranas (evaluada con la prueba hipoosmótica (HOS) en espermatozoides equinos incubados durante 3 horas en condiciones que promueven la capacitación (medio Modified Whittens adicionado con 15mM de bicarbonato y 6mg/ml BSA), en presencia o ausencia de 50% de plasma seminal homólogo ( $n=3$ ;  $r=4$ ).

Tiempo incubación (h)	Viabilidad (% CFDA)		Funcionalidad de membranas (% HOS)	
	0% Plasma	50% Plasma	0% Plasma	50% Plasma
0	74 ± 16 <sup>a A</sup>	45 ± 24 <sup>a B</sup>	26 ± 11 <sup>c</sup>	25 ± 15 <sup>c</sup>
1,5	64 ± 21 <sup>a A</sup>	39 ± 22 <sup>a B</sup>	15 ± 6 <sup>d</sup>	11 ± 11 <sup>d</sup>
3	49 ± 22 <sup>b A</sup>	36 ± 25 <sup>a B</sup>	11 ± 7 <sup>d</sup>	9 ± 8 <sup>d</sup>

<sup>a,b</sup> indican diferencias significativas en el tiempo en las columnas de viabilidad espermática ( $P < 0,05$ )  
<sup>A,B</sup> indican diferencias significativas en viabilidad espermática entre la presencia o ausencia de 50% de plasma seminal en el medio de incubación ( $P < 0,05$ )  
<sup>c,d</sup> indican diferencias significativas en el tiempo en las columnas de funcionalidad de membrana ( $P < 0,05$ ). No se observaron diferencias significativas en la funcionalidad de membrana entre las muestras incubadas en presencia o ausencia de 50% de plasma seminal ( $P > 0,05$ ).

Tabla 2. Respuesta de la membrana (evaluada con la tinción Clortetraciclina, CTC) en espermatozoides equinos incubados 3 h en condiciones que promueven la capacitación (medio Modified Whittens adicionado con 15mM de bicarbonato y 6mg/ml BSA), en presencia o ausencia de 50% de plasma seminal homólogo ( $n=3$ ;  $r=4$ )

Tiempo de incubación (h)	CTC (%)					
	0 % plasma seminal			50 % plasma seminal		
	NC	C	RA	NC	C	RA
0	57 ± 16 <sup>a</sup>	29 ± 16 <sup>a</sup>	14 ± 11 <sup>a</sup>	66 ± 15 <sup>a</sup>	22 ± 18 <sup>a</sup>	11 ± 5 <sup>a</sup>
1,5	63 ± 15 <sup>a</sup>	19 ± 12 <sup>b</sup>	18 ± 10 <sup>ab</sup>	63 ± 18 <sup>a</sup>	18 ± 12 <sup>b</sup>	17 ± 9 <sup>ab</sup>
3	58 ± 15 <sup>a</sup>	16 ± 10 <sup>b</sup>	25 ± 11 <sup>b</sup>	65 ± 11 <sup>a</sup>	15 ± 10 <sup>b</sup>	19 ± 8 <sup>b</sup>

NC: espermatozoides no capacitados, evaluados con la tinción Clortetraciclina  
 C: espermatozoides capacitados, evaluados con la tinción Clortetraciclina  
 RA: espermatozoides reaccionados, evaluados con la tinción Clortetraciclina  
<sup>a,b</sup> indican diferencias significativas, en las columnas, entre los diferentes tiempos de incubación para cada una de las categorías ( $p < 0,05$ ). No se observaron diferencias significativas entre las muestras incubadas en presencia o ausencia de 50% de plasma seminal ( $P > 0,05$ ).

Tabla 3. Respuesta de la membrana (evaluada con la tinción Filipin) en espermatozoides equinos incubados 3 h en condiciones que promueven la capacitación (medio Modified Whittens adicionado con 15mM de bicarbonato y 6mg/ml BSA), en presencia o ausencia de 50% de plasma seminal homólogo (n=3; r=4)

Tiempo de incubación (h)	Filipin (%)					
	0 % plasma seminal			50 % plasma seminal		
	NC	C	RA	NC	C	RA
0	70 ± 9 <sup>a</sup>	17 ± 8 <sup>a</sup>	14 ± 5 <sup>a</sup>	69 ± 15 <sup>a</sup>	18 ± 8 <sup>a</sup>	14 ± 9 <sup>a</sup>
1,5	56 ± 16 <sup>b</sup>	23 ± 8 <sup>b</sup>	22 ± 9 <sup>b</sup>	57 ± 15 <sup>b</sup>	19 ± 7 <sup>a</sup>	24 ± 11 <sup>b</sup>
3	57 ± 17 <sup>b</sup>	22 ± 10 <sup>b</sup>	20 ± 11 <sup>b</sup>	42 ± 17 <sup>b</sup>	23 ± 6 <sup>b</sup>	33 ± 17 <sup>b</sup>

NC: espermatozoides no capacitados evaluados con la tinción Filipin

C: espermatozoides capacitados evaluados con la tinción Filipin

RA: espermatozoides reaccionados evaluados con la tinción Filipin

<sup>a,b</sup> indican diferencias significativas, en las columnas, entre los diferentes tiempos de incubación para cada una de las categorías (p<0,05). No se observaron diferencias significativas entre las muestras incubadas en presencia o ausencia de 50% de plasma seminal (P>0,05).

Al evaluar las muestras teñidas con Filipin, se observó una disminución significativa en la categoría espermatozoides no capacitados (P=0,002) al igual que un aumento en las categorías capacitados (P=0,007) y reaccionados (P=0,0008) en función del tiempo, evidenciando esta diferencia a partir de la hora y media de incubación en medio de capacitación. No se observaron diferencias significativas en ninguna de las categorías de espermatozoides teñidos con Filipin por la presencia o ausencia de plasma seminal en el medio de incubación (P>0,05) (ver Tabla 3).

Por último, al evaluar los acrosomas mediante la tinción con Coomassie blue, sólo se observó un aumento significativo del porcentaje de espermatozoides sin acrosoma a las 3 h de incubación (T 0h= 5±4; T 1,5h= 10±5; T 3h= 13±6; P=0,01), no observando un efecto de la presencia de plasma seminal en el medio sobre los mismos.

Al analizar la posible correlación entre las diferentes técnicas, en la capacitación espermática evaluada con las tinciones de CTC y de Filipin, se observó una correlación positiva en la categoría de espermatozoides no-capacitados (NC) (r=0,42; P=0,02), sin embargo esto no se comprobó en la categoría de espermatozoides capacitados (C) ni de espermatozoides reaccionados (RA), aunque se observó una tendencia en esta última categoría (RA). En el caso de la evaluación de los espermatozoides reaccionados, se encontró que los resultados obtenidos mediante tinción con CTC presentan una tendencia a correlación positiva con los valores obtenidos utilizando Coomassie blue (r=0,24, p = 0,08).

## DISCUSIÓN

Si bien el número de espermatozoides que evidenciaron signos de capacitación y reacción acrosomal (sin inductores de la RA) varió entre metodologías, las tendencias y diferencias registradas en función de los parámetros estudiados (tiempo de incubación y porcentaje de plasma seminal) fueron las mismas independientemente de la tinción empleada.

En la mayoría de los trabajos donde se realiza la incubación en condiciones de capacitación, la misma se realiza durante 3 horas. En este trabajo, se observó con las técnicas de CTC y Filipin que la respuesta de la membrana ya se evidencia a la hora y media de incubación, no registrando diferencias significativas a las 3 h. Por otra parte, se observó una disminución significativa de la viabilidad espermática recién a las 3 h de incubación. Esto nos estaría indicando que sería conveniente disminuir los tiempos de incubación en condiciones de capacitación, siendo que prolongar los tiempos va en detrimento de la viabilidad y los resultados de capacitación y reacción acrosomal ya se evidencian a la hora y media.

Posiblemente la falta de correlación entre las categorías de espermatozoides capacitados y reaccionados entre las tinciones de CTC y Filipin se deba a que miden cambios a nivel de membrana que se producen en diferentes momentos del proceso de capacitación, dado que tenderían a unificarse los resultados en los espermatozoides reaccionados, hacia el final del proceso. En este trabajo, se observó que el movimiento del colesterol, evidenciado por el Filipin, se produciría más tempranamente que los cambios evidenciados por la clortetraciclina. Para

ahondar más en este estudio, tanto a nivel metodológico como biológico, sería necesario aumentar el número de padrillos evaluados. Esto permitirá reducir la variación observada y quizás lograr una correlación positiva entre estas dos técnicas y percibir una diferencia estadística en los casos en que solo se observó una tendencia.

La tendencia a correlación observada entre la tinción CTC y el Coomassie blue al estudiar el porcentaje de espermatozoides reaccionados, respaldaría la aplicación del CB a campo como un método simple que nos indica el estado acrosomal.

## CONCLUSION

Como se esperaba, ambos factores analizados (porcentaje de plasma seminal y tiempo de incubación) mostraron tener efecto sobre el número de espermatozoides que evidencian capacitación y reacción acrosomal. En el caso del tiempo de incubación, se evidenció que sería conveniente reducir los tiempos porque la capacitación ya se observa a la hora y media y prolongar la misma solo va en detrimento de la viabilidad espermática. Por otro lado, resta estudiar el efecto del agregado de porcentajes de plasma seminal inferiores a 50%, para poder establecer su efecto sobre los espermatozoides. Conocer los efectos del plasma seminal sobre la capacitación espermática podría permitir mejorar los protocolos de congelamiento profundo de espermatozoides equinos.

## REFERENCIAS

- Brum AM, Thomas AD, Sabeur K, Ball BA. Evaluation of Coomassie blue staining of the acrosome of equine and canine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 2006; 67: 358-62.
- Colenbrander B, Brouwers JFHM, Neild DM, Stout TAE, da Silva P, Gadella BM. Capacitation dependent lipid rearrangements in the plasma membrane of equine sperm. *Theriogenology* 2002; 58: 341-345.
- Giuliano SM, Bisiau C, Carretero MI, Arraztoa C, Neild D. Use of Coomassie blue to evaluate acrosomal status in llama spermatozoa. Preliminary results. *Revista InVet* 2012; 14(2): 279.
- Katila T, Kareskoski AM, Venhoranta H, Virtala AM, 2010. The proportion of seminal plasma and the outcome of inseminations with transported stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.* 121, 194-195.
- McPartlin LA, Suarez SS, Czaya CA, Hinrichs K, Bedford-Guaus SJ. Hyperactivation of stallion sperm is required for successful in vitro fertilization of equine oocytes. *Biol. Reprod.* 2009; 81(1): 199-206.
- Neild DM, Chaves MG, Flores M, Mora N, Beconi MT, Agüero A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology* 1999; 51: 721-727.
- Varner DD, Ward CR, Storey BT, Kenney RM. Induction and characterization of acrosome reaction in equine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 1987; 48 (9): 1383-1389.