

**DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DE LAS MEMBRANAS ESPERMÁTICAS  
PORCINAS MEDIANTE TRIPLE TINCIÓN FLUOROCRÓMICA EN SEMEN FRESCO  
Y REFRIGERADO**

Assessment of boar spermatic membranes with triple fluorochromic stain in fresh  
and chilled semen

Jorge Suhevic<sup>2</sup>, Daniela Malcervelli<sup>1</sup>, Pablo Torres<sup>1</sup>, Celeste Fratto<sup>1</sup>, Julieta Miguel<sup>1</sup>,  
María Laura Fischman<sup>3</sup>, Humberto Cisale<sup>3</sup>

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.30>

<sup>1</sup> *Especialista,*

<sup>2</sup> *Magister,*

<sup>3</sup> *Doctor,*

*Cátedra Física Biológica, INITRA,  
Facultad de Ciencias Veterinarias,  
Universidad de Buenos Aires,  
Proyecto UBACyT  
20020130100648BA.  
Buenos Aires, Argentina.*

E-mail: jsuhevic@fvvet.uba.ar

**RESUMEN**

El potencial fecundante del semen depende tanto de la movilidad espermática como de la integridad y funcionamiento de sus membranas. El objetivo de este trabajo fue determinar mediante una triple tinción fluorocrómica (Hoechst 33342, Ioduro de Propidio, Pisum Sativum-Isotiocianato de Fluoresceína) la calidad de las membranas espermáticas en semen porcino fresco y refrigerado a 17°C. Se analizaron 14 muestras de semen fresco y de semen refrigerado provenientes de cuatro verracos terminales híbridos cruza Austral. Se incubó el semen diluido con Pisum Sativum-Isotiocianato de Fluoresceína (0,01%), Ioduro de Propidio (0,05%) y Hoechst (0,1%). Los resultados se analizaron mediante estadística descriptiva. El porcentaje de células con acrosoma intacto fue inferior en el semen refrigerado tanto para espermatozoides con membrana plasmática intacta (Fresco: 59,6%; Refrigerado: 49,92%) como lesionada (Fresco: 16,74%; Refrigerado: 10,17%). Se pudo evidenciar que durante el proceso de refrigeración la membrana más afectada es la acrosomal.

**Palabras clave:** *semen, refrigeración, membranas, fluorocromos, porcinos*

**ABSTRACT**

The fertilizing potential of sperm depends on both motility and the integrity and function of their membranes. The aim of this work was the assessment of

sperm membranes in fresh and chilled boar semen and chilled to 17°C using a triple fluorochromic stain (Hoechst 33342, Propidium Iodide, Pisum Sativum-Fluorescein Isothiocyanate). We studied 14 samples of fresh and chilled semen and chilled semen. The samples

were obtained from four terminal Austral breed terminal boars. A sample of extended semen was incubated with Pisum Sativum-Fluorescein Isothiocyanate (0,01%), Propidium Iodide (0,05%) y Hoechst (0,1%). Results were statistically analyzed. The percentage of cells with undamaged acrosome was lower in chilled semen, for both spermatozoa with intact plasmatic membrane (Fresh: 59,6%; chilled: 49,92%) and damaged plasmatic membrane (Fresh: 16,74%; Chilled: 10,17%). In conclusion, during the chilling process, the acrosome membrane was the most affected.

**Keywords:** *semen, cooling, membranes, fluorochromes, boars.*

## INTRODUCCIÓN.

La integridad de las membranas de los espermatozoides –tanto plasmática como acrosomal– es una de las principales responsables de su capacidad fecundante. Por este motivo, es de suma relevancia implementar una prueba de laboratorio única que permita predecir la capacidad fecundante del eyaculado. La calidad seminal disminuye a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento, sufriendo alteraciones como, disminución de la movilidad espermática, alteraciones en la integridad de la membrana acrosomal y plasmática como así también su funcionalidad.

El espermatozoide porcino es extremadamente sensible a la peroxidación lipídica, debido a la alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados en los fosfolípidos de membrana y a la baja capacidad antioxidante del plasma seminal, generando una excesiva formación de radicales libres, perjudicando aún más la integridad y funcionalidad de las membranas (Kumaresan *et al.*, 2009).

En los últimos años se ha incrementado el uso de fluorocromos para evaluar estas estructuras. La aglutinina de Pisum Sativum (PSA), marcada con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), es una lectina que se une a los glucoconjugados de la matriz acrosomal (Bucci *et al.*, 2014). Tiene afinidad por la terminación  $\alpha$ -D-glucosil y  $\alpha$ -D-manosil residuales de glicoproteínas, y se une específicamente al azúcar  $\alpha$ -manósido de la matriz acrosomal (Bucci *et al.*, 2014). En espermatozoides no fijados, si el acrosoma se encuentra dañado posibilita el paso de la lectina, y por lo tanto, del fluorógeno al interior del compartimento acrosomal (Graham *et al.*, 1990). Esto se visualiza como una fluorescencia verde-amarillenta ( $\lambda_{emisión}=525$  nm) sobre la porción anterior de la cabeza y en el segmento ecuatorial. El loduro de Propidio (PI) es un

fluorocromo que solamente ingresa a las células espermáticas cuando éstas presentan su membrana plasmática dañada emitiendo fluorescencia color rojo ( $\lambda_{emisión}=570$  nm) (Sutkeviene *et al.*, 2009). El Hoechst 33342 (H) es un colorante intercalante del ADN, que se une preferentemente a las regiones adenina-timina de la cadena menor emitiendo fluorescencia color azul ( $\lambda_{emisión}=483$  nm) (Maside *et al.*, 2012).

El objetivo de nuestro trabajo fue determinar mediante una triple tinción fluorocrómica (Hoechst 33342, loduro de Propidio, Pisum Sativum-Isotiocianato de Fluoresceína) la calidad de las membranas espermáticas en semen porcino fresco y refrigerado a 17°C.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 14 muestras de semen porcino fresco y 14 muestras de semen porcino refrigerado a 17°C. Los eyaculados se obtuvieron de cuatro verracos híbridos, machos terminales cruza Austral (1/3 Large White, 1/3 Pietrain y 1/3 Hampshire), alimentados con una dieta balanceada a base de maíz y soja. Dichos animales se encontraban alojados en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires. La recolección del semen se realizó mediante la técnica de mano enguantada (Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio CICUAL). El semen se mantuvo a 37°C hasta su llegada al laboratorio. Las muestras refrigeradas se diluyeron en Androstar® (relación 1:1) y se estabilizaron a temperatura de laboratorio durante 20 minutos. Finalizada la estabilización, las muestras se colocaron en balcón de frío a 17°C. Una vez allí se realizaron las siguientes evaluaciones:

### *Evaluación simultanea de la integridad de la membrana plasmática y acrosomal con fluorocromos*





Se diluyó la muestra seminal en solución buffer fosfato (PBS) hasta alcanzar una concentración de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Una alícuota de 50  $\mu$ l se incubó con 12,5  $\mu$ l de PSA-FITC (0,01%) y 1  $\mu$ l de PI (0,05%) durante 15 minutos a 37°C. Se agregó 1,5  $\mu$ l de H (0,1%) continuando la incubación a la misma temperatura durante otros 15 minutos. Se evaluaron 500 espermatozoides con objetivo de 100x, utilizando un microscopio de epifluorescencia (Lancet, 2001A) y filtro de excitación UV.

La aparición de color azul en la cabeza de los espermatozoides indica que la membrana plasmática se encuentra intacta (H+). La ausencia de fluorescencia

verde en la región anterior de la cabeza (PSA/FITC-) indica que la membrana acrosomal no se encuentra afectada. El daño en la membrana plasmática se observa como una fluorescencia de color rojo (PI+). Si la membrana acrosomal está dañada se observa fluorescencia verde en la porción anterior de la cabeza (PSA/FITC+). De las posibles combinaciones factibles de ser observadas, los espermatozoides se clasificaron

como: membrana plasmática y acrosomal intacta, membrana plasmática y acrosomal dañadas, membrana plasmática intacta y acrosomal dañada y membrana plasmática dañada y acrosomal intacta. Las diferentes combinaciones posibles se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Coloración fluorocrómica observada según el estado de las membranas plasmáticas y acrosomal

Color cabeza	Color porción anterior	Subpoblaciones espermáticas	Estado memb. plasmática	Estado memb. acrosomal
Azul (H+)	Sin color (PSA~FITC-)		Intacta	Intacta
Azul (H+)	Verde (PSA~FITC+)		Intacta	Dañada
Rojo (PI+)	Sin color (PSA~FITC-)		Dañada	Intacta
Rojo (PI+)	Verde(PSA~FITC+)		Dañada	Dañada

Se representa el color observado mediante fluorescencia y su correspondiente relación con la integridad de membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides porcinos.

*Análisis estadístico*

El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante estadística descriptiva. Se empleó el software Infostat versión 2011p.

**RESULTADOS**

En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos (medias y desviación estándar), correspondientes a los

distintos parámetros espermáticos analizados en el semen fresco y en el refrigerado a 17°C.

Tanto en el semen fresco como en el semen refrigerado, se observó que la mayoría de los espermatozoides presentaban su membrana plasmática íntegra y su acrosoma intacto (H+, PSA FITC-). En el semen refrigerado hubo un mayor porcentaje de espermatozoides que sufrieron daño en la membrana acrosomal (H+ PSA FITC+ y PI+ PSA FITC+) independientemente del estado de su membrana plasmática (Gráfico 1).

Tabla 2. Porcentaje de las diferentes subpoblaciones espermáticas obtenidas en semen fresco y refrigerado

		Fresco		Refrigerado	
		Media (%)	D.E (%)	Media (%)	D.E (%)
TRIPLE TINCIÓN	H+ PSA FITC -	59,6	11,73	49,92	11,93
	H+ PSA FITC +	8,71	10,06	19,98	5,59
	PI+ PSA FITC -	16,74	12,07	10,17	7.28
	PI+ PSA FITC +	14,99	7,2	19,95	3,94

Medias y desvíos estándar (%) de cada una de las subpoblaciones espermáticas obtenidas a partir de la triple tinción fluorocrómica en semen fresco y refrigerado a 17°C.

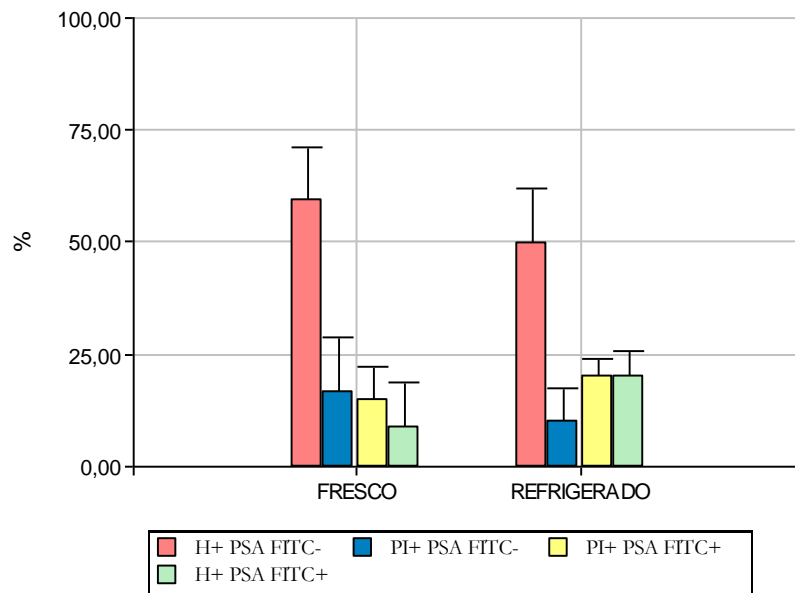


Grafico 1. Subpoblaciones espermáticas en semen fresco y refrigerado. Medias y desvíos estándar (%) de las diferentes poblaciones observadas con la triple tinción en semen fresco y refrigerado a 17°C.

## DISCUSIÓN

Mediante la técnica de triple tinción fluorescente se obtuvo una intensidad de coloración que permitió una lectura correcta, no existiendo interferencia de tinción entre los fluorocromos. Además el procedimiento resultó práctico en condiciones de laboratorio. Al evaluar dos parámetros espermáticos en forma simultánea, se logró una mayor eficiencia para la obtención de los resultados (Miguel *et al.*, 2014). De esta forma se pudo clasificar a las células espermáticas en cuatro subpoblaciones de acuerdo a los patrones fluorescentes obtenidos (membrana plasmática y acrosomal intacta, membrana plasmática y acrosomal dañadas, membrana plasmática intacta y acrosomal dañada y membrana plasmática dañada y acrosomal intacta).

El porcentaje de células con acrosoma intacto fue inferior en el semen refrigerado tanto en el caso de espermatozoides con membrana plasmática intacta (Fresco: 59,6%; Refrigerado: 49,92%) como lesionada (Fresco: 16,74%; Refrigerado: 10,17%). En ambos casos aumentó el porcentaje de células con acrosoma dañado independientemente del estado de la membrana plasmática. En el caso de espermatozoides con la membrana plasmática intacta, el porcentaje de acrosomas dañados fue de 8,71% para el semen fresco y de 19,98% para el refrigerado, mientras que en el caso de las células con ambas membranas

dañadas fue de 14,99% para el fresco y 19,95% para el refrigerado.

## CONCLUSIÓN

La técnica de triple tinción fluorescente permitió identificar en una sola evaluación los espermatozoides potencialmente útiles al momento de la fecundación para predecir su potencial fertilidad.

Se logró identificar de forma rápida y simultánea el estado de la membrana plasmática y acrosomal, obteniendo un dato de gran importancia a la hora de elaborar dosis para inseminación artificial o evaluar espermatozoides sometidos a procesos que pudiesen alterar las membranas, como el refrigerado o la congelación, entre otros.

## REFERENCIAS

- Bucci D, Isani G, Giaretta E, Spinaci M, Tamanini C, Ferlizza E, Galeati G. Alkaline phosphatase in boar sperm function. *Andrology*; 2014; 2(1):100-106.
- Graham K, Kunze E, Hammerstedt RH. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of reproduction*, 1990, 43, 55-64.
- Kumaresan A, Kadirvel G, Bujarbaruah K, Bardoloi R, Das A, Kumar S, Naskar S, Preservation of boar

- semen at 18°C induces lipidperoxidation and apoptosis like changes in spermatozoa, *Animal Reproduction Science* 2009, 110 162–171
- Maside C, Gil MA, Cuello C, Sanchez-Osorio J, Parrilla I, Lucas X, Camaño JN, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA; Effects of Hoechst 33342 staining and ultraviolet irradiation on the developmental competence of in vitro-matured porcine oocytes; *Theriogenology* 2011; 79: 1667-1675.
  - Miguel J, Suhevic J, Malcervelli D, Fratto C, Fischman ML, Cisale H; Utilización de fluorocromos para la evaluación de las membranas plasmática y acrosomal en espermatozoides porcinos, VII Congreso de Producción Porcina del Mercosur, XII Congreso Nacional de Producción Porcina, XVIII Jornadas de Actualización Porcina 2014; Mar del Plata, Argentina.