

MI PROYECTO DE TESIS

Optimización de los protocolos de congelación de eyaculados de oso pardo (*Ursus arctos*).

Manuel Álvarez Rodríguez

Licenciado en Biología

Departamento de Medicina, Cirugía y Anatomía Veterinaria. Unidad de Reproducción y Obstetricia. Universidad de León

La situación crítica del oso pardo (*Ursus arctos*) en España establece la necesidad de aplicar diferentes estrategias de conservación, dentro de las cuales podemos mencionar la creación de un banco de recursos genéticos, en colaboración con el parque de la naturaleza de Cabárceno (Cantabria) (**Fig. 1**). Un banco de recursos genéticos se puede definir como el almacenamiento, de manera eficaz, del material genético para su posterior uso con fines de investigación y/o conservación (en este caso muestras espermáticas con buena calidad y con un esperado alto potencial de fertilidad).



Figura 1. Oso pardo anestesiado e inmovilizado para la obtención posterior de muestras seminales. Foto tomada en el interior del recinto del Parque de la Naturaleza de Cabárceno (Santander). Foto: www.diariomontanes.es.

La eficacia de esta herramienta imprescindible depende, en gran medida, de la adaptación de los protocolos de congelación espermática. El protocolo bási-

co de congelación de espermatozoides de oso pardo comprende el estudio de múltiples parámetros diferentes.

En la presente tesis doctoral desarrollada en el grupo ITRA-ULE (Investigación en Tecnologías de la Reproducción Asistida de la Universidad de León) (**Fig. 2**) se planteaba la mejora y evolución de un protocolo de congelación de espermatozoides de oso pardo valorando diferentes experimentos., bien para muestras obtenidas mediante electroeyaculación (Anel et al., 2008) o bien con de origen epididimario (Anel et al., 2011).



Figura 2. Parte de los miembros del grupo ITRA-ULE (Investigación en Técnicas de Reproducción Asistida de la Universidad de León). Foto: Manuel Álvarez-Rodríguez.

Partiendo del conocimiento previo de varios estudios de nuestro grupo que avalan la centrifugación de las muestras inmediatamente después de obtenerlas mediante electroeyaculación (Nicolás et al., 2012a), así como los diluyentes utilizados en el procesamiento inicial de las muestras (Nicolás et al., 2011), el objetivo de primer punto de esta tesis es el estudio del modo de adición del agente crioprotector (glicerol) (Álvarez-Rodríguez et al., 2011). Los resultados de este primer trabajo permitieron concluir que se pueden llevar a cabo diferentes pautas de adición del crioprotector (glicerol) sin efecto negativo sobre la calidad espermática, constituyendo una aplicación práctica en condiciones de trabajo de campo: no importa si añadimos el glicerol antes, después o la mitad en cada paso de la refrigeración. Complementariamente a este objetivo, se llevó a cabo un segundo experimento combinado de concentración de glicerol y rampas de congelación (velocidad de congelación de las muestras espermáticas, estudiadas con el fin de establecer un equilibrio entre el tamaño y cantidad de cristales de hielo que se forman durante la congelación) (de Paz et al., 2012). Para ello, con el conocimiento de parte de la composición básica de los diluyentes de conservación

espermática (Anel et al., 2008; Anel et al., 2010), logramos establecer la concentración de glicerol ideal para la congelación de espermatozoides de oso pardo (6%) así como la rampa de congelación de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$, ya que para el rango de 4-8% de glicerol no importa la rampa de congelación utilizada ($-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$).

Un segundo objetivo planteado en la tesis consistió en la adaptación del estabilizador de membrana (sustancias capaces de minimizar el daño sufrido por los espermatozoides durante el proceso de criopreservación) al caso particular de conservación de muestras de oso pardo. Si bien la yema de huevo ha sido rutinariamente utilizada en laboratorios de andrología durante muchos años (incluido el oso pardo (Anel et al., 2010)), en la búsqueda de alternativas a la yema de huevo (Álvarez Rodríguez et al., 2012 a), la lecitina de soja no parece ser adecuada como sustituto (para una concentración de hasta el 5%) ya que se obtienen unas pérdidas tanto en movilidad como en viabilidad muy acusadas. Sin embargo, la viabilidad obtenida con los diluyentes de LDL (lipoproteínas de baja densidad) se postulan como buena una opción sustitutoria de la yema de huevo. Complementariamente, un estudio de la capacidad antioxidante total del medio confirma los resultados obtenidos, ya que obtenemos mayores capacidades en las concentraciones más altas de LDL (10-15%).

Los diluyentes pueden estar constituidos, además de los componentes básicos, por aditivos que mejoren la “congelabilidad”, es decir, la capacidad de los espermatozoides para resistir los daños sufridos durante la congelación. Surgió la necesidad, por tanto, de estudiar componentes como las proteínas de choque térmico (HSPA8) (Álvarez-Rodríguez et al., 2012 b). Este estudio permitió demostrar el efecto beneficioso de la proteína a muy bajas concentraciones (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), contrarrestado por el efecto supresor de la movilidad que ejerce la proteína al llevar a cabo un test de progresión espermática a través de mucus artificial (compuesto por ácido hialurónico).

Por último, la recongelación espermática (Álvarez-Rodríguez et al., 2012 c: enviado para publicación en PLOS One) constituye una acción clave en el aprovechamiento de los biorecursos, debido al alto valor de las muestras obtenidas en esta especie y, en general en especies silvestres. Los buenos resultados de calidad obtenidos, tras el segundo ciclo de congelación, suponen una confirmación del protocolo especie-específico optimizado que ha desarrollado nuestro grupo a lo largo de los años. Además, la selección de los espermatozoides con mayor movilidad mediante gradientes de densidad, previamente testado por nuestro grupo en oso pardo (Nicolás et al., 2012b), permite la separación de subpoblaciones esper-

máticas con mayor movilidad. En combinación, recongelación y selección espermática, estos resultados abren una nueva vía de investigación en cuanto a la aplicación de nuevas estrategias biotecnológicas entre ciclos, como el sexado espermático (separación de espermatozoides X e Y).

En resumen, la optimización de las técnicas de valoración seminal, como la citometría de flujo (**Fig. 3**) así como las investigaciones llevadas a cabo por nuestro grupo suponen un paso de gigante hacia el conocimiento pormenorizado de los factores clave en el desarrollo y adaptación de un protocolo específico para la conservación de espermatozoides de oso pardo.

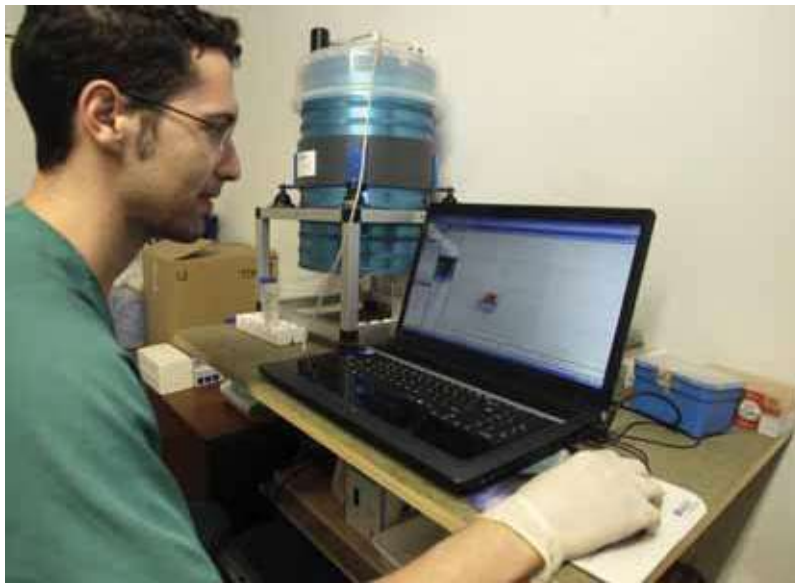


Figura 3. El autor del presente trabajo de tesis manejando un equipo portátil de citometría de flujo del grupo ITRA-ULE. Foto: www.diariomontanes.es.

Reflexión final

Me gustaría hacer mía por un instante la frase de José Vasconcelos: “Un libro, como un viaje, se comienza con inquietud y se termina con melancolía”. Si consideramos la tesis como “mi libro”, la inquietud de la investigación y el trabajo de laboratorio surgió como una expectativa real en mi vida y termina, al menos por esta etapa, con la melancolía de finalizar un sueño, el de unos padres que han sudado lo impensable por poder costear mi formación. ¡Gracias!

Bibliografía

Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Anel-López, L., Martínez-Rodríguez, C., Martínez-Pastor, F., Borragán, S., Anel, L. y de Paz, P. 2012a. Antioxidant effect of extenders based on soybean lecithin or LDL for the

- cryopreservation of sperm from brown bear (*Ursus arctos*). *Reproduction, Fertility and Development*. Aceptado: Noviembre 2012.
- Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Borragán, S., Martínez-Pastor, F., Holt, W.V., Fazeli, A., Anel, L. y de Paz, P. 2012b. The addition of heat shock protein HSPA8 to cryoprotective media improves the survival of brown bear (*Ursus arctos*) spermatozoa during chilling and after cryopreservation. *Theriogenology*. Aceptado: Noviembre 2012.
- Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Borragán, S., Martínez-Pastor, F., de Paz, P. y Anel, L. 2012c. Brown bear sperm refreezing: effect of elapsed time and use of PureSperm® gradient between freeze-thaw cycles. *PLOS One*. Enviado: Diciembre 2012.
- Alvarez-Rodríguez, M., Alvarez, M., Gomes-Alves, S., Borragan, S., Martinez-Pastor, F., de Paz, P. y Anel L. 2011. Quality of frozen-thawed semen in brown bear is not affected by timing of glycerol addition. *Theriogenology* 75:1561-1565.
- Anel, L., Alvarez, M., Martínez-Pastor, F., Gomes, S., Nicolás, M., Mata, M., Martínez, A.F., Borragan, S., Anel, E. y de Paz, P. 2008. Sperm cryopreservation in brown bear (*Ursus arctos*): preliminary aspects. *Reproduction in Domestic Animals*. 1. 43: 9–17.
- Anel, L., Gomes-Alves, S., Álvarez, M., Borragán, S., Anel, E., Nicolás, M., Martínez-Pastor, F. y de Paz, P. 2010. Effect of basic factors of extender composition on post-thawing quality of brown bear electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology*. 74:643–651
- Anel, L., Alvarez, M., Anel, E., Martínez-Pastor, F., Martínez, F., Chamorro, C. y de Paz, P. 2011. Evaluation of three different extenders for use in emergency salvaging of Epididymal spermatozoa from a Cantabric brown bear. *Reproduction in Domestic Animals*. 46:85–90.
- de Paz, P., Alvarez-Rodríguez, M., Nicolás, M., Alvarez, M., Chamorro, C.A., Borragán, S., Martínez-Pastor, F. y Anel, L. 2012. Optimization of glycerol concentration and freezing rate in the cryopreservation of ejaculate from Brown bear (*Ursus arctos*). *Reproduction in Domestic Animals*. 47: 105-112.
- Nicolás, M., Alvarez, M., Gomes-Alves, S., Mata-Campuzano, M., Borragan, S., Martínez-Pastor, F., de Paz, P. y Anel, L. 2011. Effects on brown bear (*Ursus arctos*) spermatozoa freezability of different extender and dilution ratios used for pre-freezing centrifugation. *European Journal of Wildlife Research*. 57:259–266.

- Nicolás, M., Alvarez, M., Anel, E., Martínez, F., Borragán, S., Martínez-Pastor, F., de Paz, P. y Anel, L. 2012a. Spermatozoa recovery and post-thawing quality of brown bear ejaculates is affected for centrifugation regimes. *European Journal of Wildlife Research*. 58: 77–84.
- Nicolás, M., Alvarez, M., Borragán, S., Martínez-Pastor, F., Chamorro, C.A., Alvarez-Rodríguez, M., de Paz, P. y Anel, L. 2012b. Evaluation of the qualitative and quantitative effectiveness of three media of centrifugation (MaxiFreeze®, Cushion Fluid Equine® and PureSperm® 100) in preparation of fresh or frozen-thawed brown bear spermatozoa. *Theriogenology*. 77:1119–1128.

Directores de la tesis

Dr. Luis Anel Rodríguez

Dr. Paulino de Paz Cabello