

Artículo corto:

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE TRES CRIOPROTECTORES SOBRE LA MOTILIDAD, VIABILIDAD E INTEGRIDAD ACROSOMAL DE ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS DE EPIDIDIMO DE ALPACA

Concentration effect of three cryoprotectants on the motility, viability and acrosomal integrity of sperm cryopreserved of epididymis alpaca

K.Choez *, S. Evangelista, L. Ruiz, R. Sandoval, A. Santiani

*Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria,
Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima- Perú.*

**E-mail (Katherine Choez): kathyvet3@hotmail.com*

RESUMEN

ABSTRACT

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de diferentes concentraciones de glicerol, etilenglicol y dimetil sulfóxido sobre la motilidad, viabilidad e integridad acrosomal de espermatozoides criopreservados de epidídimo de alpaca. Se utilizaron 30 testículos del Camal Municipal de Huancavelica. Los testículos fueron distribuidos en 3 grupos para glicerol (n=10), etilenglicol (n=10) y dimetil sulfóxido (n=10). Se usó el dilutor leche descremada- yema de huevo y fructosa para la recuperación y dilución de los espermatozoides epididimarios, luego los espermatozoides diluidos fueron distribuidos equitativamente en 8 alícuotas para cada una de las concentraciones de los tres crioprotectores (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5 y 1.75 M). Se empleó una curva de enfriamiento lenta y el método de vapores de nitrógeno antes de sumergirlo al tanque de nitrógeno líquido para su congelación. Para el análisis estadístico se utilizó un modelo lineal generalizado y la prueba de LSD. Los resultados obtenidos mostraron que los porcentajes más altos de motilidad, viabilidad e integridad acrosomal se encontraron en los grupos congelados con glicerol y DMSO y utilizando la concentración de 1 M.

Palabras Clave: *Alpaca, criopreservación, espermatozoide*

The aim of this study was to determine the effect of different concentrations of glycerol, ethylene glycol and dimethyl sulfoxide on motility, viability and acrosomal integrity of cryopreserved epididymal alpaca sperm. Thirty testicles obtained from Huancavelica Municipal slaughterhouse were used. The testes were divided into 3 groups: glycerol (n = 10), ethylene glycol (n = 10) and dimethyl sulfoxide (n = 10). An extender based on skim-milk, egg yolk and fructose was used for recovery and dilution of epididymal sperm, then the diluted sperm were distributed equally into 8 aliquots for each of the concentrations of the three cryoprotectants (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5 and 1.75 M). Samples were cooled using a slow cooling curve and then, straws were exposed to vapours of liquid nitrogen for freezing. For statistical analysis, a generalized linear model and LSD test was used. The results showed that the highest percentages of motility, viability and acrosomal integrity were found in samples frozed with glycerol or DMSO at concentrations of 1 M.

Key words: *Alpaca, criopreservación, espermatozoa*

INTRODUCCIÓN

El proceso de criopreservación no solo provoca alteraciones en los espermatozoides que no sobreviven, sino que también puede producir modificaciones irreversibles en la membrana plasmática y en el acrosoma de algunos espermatozoides sobrevivientes, reduciendo el tiempo de vida y la capacidad de fecundación.

El agente crioprotector juega un papel importante en el éxito de la criopreservación al mantener la viabilidad espermática, previniendo el daño producido por el proceso de congelación y descongelación (Watson, 2000). En alpacas, el crioprotector más utilizado es el glicerol; el cual ha sido empleado en concentraciones de 2 – 7 % (0.27- 0.96 M) (Santiani *et al.*, 2005; Morton *et al.*, 2010; Terreros *et al.*, 2012); sin embargo debido a los efectos tóxicos del glicerol se han utilizado otros agentes crioprotectores como el etilenglicol y dimetil sulfóxido. Con respecto a la concentración de etilenglicol, se ha usado 1 y 7 % (0.2 y 1.25 M) (Santiani *et al.*, 2005; Terreros *et al.*, 2012), mientras que la concentración de DMSO utilizada fue del 7 % (0.98 M) (Terreros *et al.*, 2012).

Los resultados de motilidad obtenidos después de la criopreservación con estas concentraciones han sido variables (desde 0 – 31%) y pobres para un protocolo de criopreservación (Santiani *et al.*, 2005; Morton *et al.*, 2010; Terreros *et al.*, 2012). Además, la concentración de los crioprotectores está influenciada por la composición del dilutor, la velocidad de enfriamiento y el método de congelación y descongelación utilizado, haciendo difícil una estandarización del protocolo de criopreservación. Por lo que es esencial determinar una concentración adecuada de los crioprotectores glicerol, etilenglicol y dimetil sulfóxido para los espermatozoides epididimarios de alpaca.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Se recolectaron 30 testículos del Camal Municipal de Huancavelica, los que fueron transportados durante 20 horas aproximadamente en cloruro de sodio al 0.9% a 5°C al Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria, UNMSM- Lima, para su procesamiento. Los testículos fueron distribuidos en 3 grupos para que los espermatozoides recuperados sean congelados con glicerol (n=10), etilenglicol (n=10) y dimetil sulfóxido (n=10).

Para la recuperación de los espermatozoides epididimarios, se utilizaron 4 ml del dilutor leche descremada-yema de huevo-fructosa a 35 °C por cada testículo (Santiani *et al.*, 2005). Posteriormente, se colocaron 8 alícuotas de 0.5 ml en diferentes tubos. El enfriamiento (35°C a 5°C) fue realizado en 150 minutos aproximadamente (1°C/5min). Luego, a cada tubo se le añadió lentamente uno de los tres crioprotectores en distintas concentraciones (0, 0.25, 0.50, 0.75, 1, 1.25, 1.5 y 1.75 M). Luego, se dejaron estabilizar por 30 minutos a 5 °C y se procedió a envasar en pajillas de 0.25 ml. Las pajillas fueron expuestas a vapores de nitrógeno por 20 minutos y luego almacenadas en nitrógeno líquido hasta su evaluación.

El descongelamiento de las pajillas se realizó en baño maría a 37 °C por 1 minuto. Los espermatozoides epididimarios fueron evaluados luego de la recuperación de los espermatozoides epididimarios a 35 °C después de la

criopreservación mediante la observación de la motilidad y la viabilidad e integridad acrosomal a través de la técnica de doble tinción azul tripán 2% y giemsa 20% (Didión *et al.*, 1989). Los valores de motilidad y viabilidad e integridad acrosomal fueron transformados a valores angulares para aproximarse a la distribución normal. Para el análisis estadístico se empleó el modelo lineal generalizado del programa IBM SPSS Statistics Version 22.0.

El análisis consideró como factores a los crioprotectores, las concentraciones y los epidídimos. El modelo evaluado consideró la interacción entre los crioprotectores y las concentraciones, los efectos principales de los crioprotectores y las concentraciones, y como factor anidado, a los epidídimos dentro de los crioprotectores. En el análisis se consideró la interacción posible entre los crioprotectores y las concentraciones. Se utilizó un contraste polinómico ortogonal para determinar el efecto del incremento de las concentraciones. Un nivel de significancia de 5% fue considerado como significativo. Se estimaron las medias y se usó la prueba de LSD para determinar la diferencia estadística significativa entre los tratamientos.

RESULTADOS

En el presente estudio, los espermatozoides epididimarios presentaron en promedio porcentajes de motilidad y viabilidad e integridad acrosomal inicial de 56 ± 14.03 y 49.35 ± 14.95 % respectivamente. Al evaluar el efecto de las diferentes concentraciones y los crioprotectores sobre el porcentaje de motilidad post descongelamiento, se encontró que la interacción entre ambos factores fué altamente significativa (p<0.001), lo que se observa al comparar el efecto del etilenglicol con los otros dos crioprotectores, en el cual podemos observar que independientemente de la concentración empleada el etilenglicol, siempre ocasiona un mayor daño en la motilidad de los espermatozoides, a diferencia del glicerol y DMSO, que a concentraciones cercanas al 1 M, se observó una menor disminución de la motilidad.

Tabla 1. Efecto de las diferentes concentraciones de glicerol, etilenglicol y DMSO sobre el porcentaje de motilidad en espermatozoides epididimarios congelados- descongelados de alpaca.

Concentración (Molar)	Motilidad (%)			
	Glicerol	Etilenglicol	DMSO	Promedio
0	6.3 ± 4.45	3.3 ± 3.37	6.4 ± 4.58	5.3 ± 4.13 ^f
0.25	13.8 ± 12.67	4.5 ± 6.02	11.1 ± 5.92	9.8 ± 8.20 ^d
0.5	15 ± 12.91	4.9 ± 5.17	13.4 ± 8.18	11.1 ± 8.75 ^{ck}
0.75	17.5 ± 13.79	5.8 ± 6.60	20.5 ± 9.26	14.6 ± 9.88 ^b
1	23 ± 16.19	6.8 ± 6.27	22 ± 8.88	17.3 ± 10.45 ^a
1.25	22.5 ± 18.14	6.2 ± 5.83	18 ± 8.56	15.6 ± 10.84 ^{ba}
1.5	17.3 ± 13.40	5.4 ± 5.10	12 ± 5.37	11.6 ± 7.96 ^c
1.75	13.7 ± 12.38	4.8 ± 4.05	11.4 ± 5.76	10 ± 7.40 ^f
Promedio	16.1 ± 12.99 ^a	5.2 ± 5.30 ^f	14.4 ± 7.06 ^c	

Valores son promedios ± D.S.

^{a, b, c, d, e} Letras diferentes dentro de una fila indican diferencias significativas (p<0.05)

^{x, y} Letras diferentes dentro de una columna indican diferencias significativas (p<0.05)



Con respecto al efecto de los crioprotectores, se encontró que este también fue altamente significativo ($p < 0.001$), encontrándose que el glicerol fue mejor para la criopreservación de espermatozoides de alpaca, seguido del DMSO, y por último el etilenglicol (Tabla 1). Por otro lado, el efecto de las concentraciones también fue altamente significativo ($p < 0.001$), se encontró que el efecto de las concentraciones fue de orden quintico ($p = 0.012$), observándose un efecto creciente con el incremento de la concentración hasta 1 M, luego del cual el incremento de la concentración ocasiona una disminución de la motilidad.

Tabla 2. Efecto de las diferentes concentraciones de glicerol, etilenglicol y DMSO sobre el porcentaje de viabilidad e integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios congelados- descongelados de alpaca.

Concentración (Molar)	Viabilidad e integridad acrosomal (%)			
	Glicerol	Etilenglicol	DMSO	Promedio
0	15.6 ± 5.46	8.1 ± 5.72	7.4 ± 4.77	10.37 ± 5.32 ^d
0.25	19.7 ± 6.55	13.1 ± 8.02	17.1 ± 6.52	16.63 ± 7.03 ^a
0.5	19.3 ± 8.42	12 ± 8.21	14.65 ± 5.08	15.32 ± 7.24 ^{ab}
0.75	21.2 ± 8.36	13.1 ± 8.95	15.45 ± 3.73	16.58 ± 7.01 ^a
1	18.2 ± 6.76	11.1 ± 7.28	15.3 ± 6.46	14.87 ± 6.83 ^{ab}
1.25	20 ± 9.71	9.3 ± 6.83	13.75 ± 7.32	14.35 ± 7.95 ^{bc}
1.5	15.4 ± 6.77	9.8 ± 6.80	11.5 ± 1.41	12.23 ± 4.99 ^{cd}
1.75	14 ± 5.52	8.6 ± 6.08	9.4 ± 4.99	10.67 ± 5.53 ^d
Promedio	17.9 ± 7.2 ^a	10.6 ± 7.2 ^c	13.1 ± 5.0 ^b	

Valores son promedios ± D.S.

^{a,b,c} Letras diferentes dentro de una fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

^{a,b,c} Letras diferentes dentro de una columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

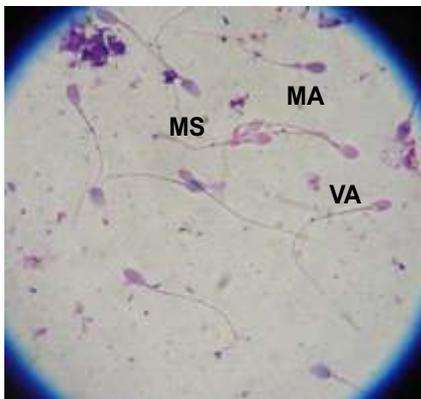


Figura 1. Evaluación de la viabilidad e integridad acrosomal (Técnica de Doble Tinción Azul Tripán / Giemsa). VA (espermatozoide vivo con acrosoma intacto), MA (espermatozoide muerto con acrosoma intacto), MS (espermatozoide muerto con acrosoma desprendido).

DISCUSIÓN

En cuanto al porcentaje de motilidad, nuestros resultados son semejantes a los obtenidos por Terreros *et al.* (2012), quienes reportan porcentajes de 23.89, 8.3 y 31.11 % para glicerol, etilenglicol y DMSO al 1 M.

Por otro lado, Santiani *et al.* (2005) reportan menores resultados (15.3 %) cuando utilizó glicerol a 1 M; sin embargo al utilizar la concentración de 1.25 M de etilenglicol obtuvieron un 20 % de motilidad post descongelamiento, lo que es opuesto a nuestro estudio.

Es importante recalcar que en el mencionado estudio se utilizó semen eyaculado, el cual fue procesado inmediatamente, al contrario de nuestro estudio donde se utilizaron espermatozoides epididimarios que se procesaron después de 20 horas de obtenida la muestra. Con respecto al efecto de la concentración y los crioprotectores sobre la viabilidad e integridad acrosomal, no hubo efecto de la interacción de las concentraciones con los crioprotectores, por lo cual, los tres crioprotectores se desempeñaron de la similar manera en las diferentes concentraciones ($p = 0.632$). Se encontró un efecto altamente significativo de los crioprotectores ($p < 0.001$) y de las concentraciones ($p < 0.001$).

Con respecto a los crioprotectores, se encontró, al igual que para la motilidad, que el glicerol fue mejor para la criopreservación de espermatozoides de alpaca, seguido del DMSO, y por último el etilenglicol (Tabla 2). Por otro lado, el efecto de las concentraciones fue de orden cúbico ($p = 0.004$), observándose un efecto creciente con el incremento de la concentración hasta 0.75 M, luego del cual el incremento de la concentración ocasiona una disminución de la viabilidad. Estos resultados son contrarios a los obtenidos por Santiani *et al.* (2005) quienes obtuvieron 12.7 y 18.7 % con glicerol y etilenglicol al 7% (1 M) respectivamente.

CONCLUSIÓN

Estos datos indican que los porcentajes más altos de motilidad y viabilidad/integridad acrosomal se encontraron en los grupos congelados con glicerol y DMSO y utilizando la concentración de 1 M.

REFERENCIAS

- Didion B, Dobrinsky J, Giles J, Graves C. Staining procedure to defect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res* 1989, 22:51-57.
- Morton K, Evans G, Maxwell W. Effect of glycerol concentration, Equex STM® supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen- thawed epididymal alpaca sperm. *Theriogenology*, 2010. 74:311-316.
- Santiani A, Huanca W, Sapaná R, Huanca T, Sepúlveda N, Sánchez R. Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian J Androl*, 2005. 7:303-309.
- Terreros M, Arriaga I, Huanca W. Efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*). *Resúmenes y Trabajos VI Congreso Mundial de Camélidos Sudamericanos*. 2012, Pg 71
- Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, 2000. 60:481- 492.